ORSAY
N° d'ordre : 298

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR INGENIEUR

par

Françoise LAMBERT

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INTERACTION DES CATECHOLAMINES AVEC LES PROTEINES PLASMATIQUES ADRENALINE - ALBUMINE

Soutenue le 17 juin 1976, devant la Commission d'Examen

MM. J.M. CONIA — Président

Y. COHEN
N. JULLIEN — Examinateurs

ORSAY
N° d'ordre : 298

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR INGENIEUR

par

Françoise LAMBERT

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INTERACTION DES CATECHOLAMINES AVEC LES PROTEINES PLASMATIQUES ADRENALINE - ALBUMINE

Soutenue le 17 juin 1976, devant la Commission d'Examen

MM.	J.M. CONIA	Président
	Y. COHEN	Examinateurs
	N. JULLIEN	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je remercie :

Monsieur le Professeur COHEN Doyen de la Faculté de Chatenay-Malabry qui m'a permis d'entreprendre ce travail dans son laboratoire de Pharmacodynamie (ERA 277).

Monsieur le Professeur COURSAGET, Chef du Département de Biologie qui m'a acceptée au sein de son équipe de recherche CEA.

Messieurs les Professeurs CONIA et JULLIEN de la Faculté d'Orsay qui ont accepté de présider le jury.

Monsieur ELLENBERGER qui m'a initié à la RMN et m'a sans cesse aidée dans mes travaux.

Les départements de Biologie et des Radioéléments du CEN/Saclay qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires, m'ont prêtée leurs appareils et m'ont permis de rencontrer des personnes sympathiques parmi lesquelles je remercie plus particulièrement : Messieurs MERLIN, FRAPART, BRUNEAU, TRAN DIN Son, THIERY et Madame ROUX pour leurs aimables conseils et leurs encouragements.
Je remercie également la Société ISOCHEM de m'avoir donnée la possibilité de terminer ce travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548102_0013

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION.
1. Présentation du sujet
2. Rôle physiologique de l'Adrénaline
3. Considérations structurales sur l'adrénaline
4. Importance de la liaison avec les protéines
5. Différents types de liaison avec les protéines
6. L'albumine du plasma

II - EXPERIENCES PRELIMINAIRES.
1. Electrophorèse sur cellogel
2. Ultrafiltration

III - APPLICATION DE LA RMN A L'ETUDE DES LIAISONS MEDICAMENTS-PROTEINES.
1. Généralités sur la RMN
2. Mesures de T_1 par transformation de Fourier
3. Interprétation des résultats

IV - RESULTATS EXPERIMENTAUX EN RMN DU PROTON.
1. Données spectroscopiques
2. Etude des temps de relaxation T_1 de la molécule d'adrénaline en présence de sérum albumine humaine
3. Etude des temps de relaxation T_2 de la molécule d'adrénaline en présence de sérum albumine humaine
4. Conclusion.

V - EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES.
1. Données spectroscopiques en RMN du ^{13}C
2. Temps de relaxation T_1 en RMN du ^{13}C
3. Dichroïsme circulaire magnétique

VI - CONCLUSION GENERALE.

LISTE DES ABBREVIATIONS UTILISEES.

A D : Adrénaline
G γ : Gamma globuline
HSA : Sérum albumine humaine
BSA : Sérum albumine bovine
RMN : Résonance magnétique nucléaire
δ : Déplacement chimique
J : constante de couplage
τ_c : temps de corrélation
T_1 : temps de relaxation longitudinal
T_2 : temps de relaxation transversal
D C : dichroïsme circulaire
DCM : dichroïsme circulaire magnétique

UNITES :

Ci : Curie
dpm : Desintégration par minute
Cpm : coup par minute

I - INTRODUCTION

1. Présentation du sujet

a. Etat des recherches précédentes

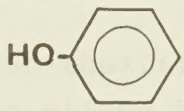
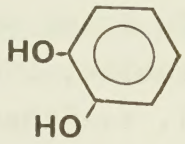
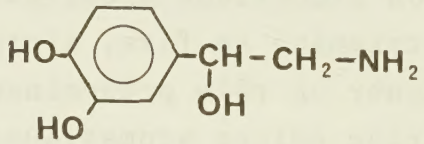
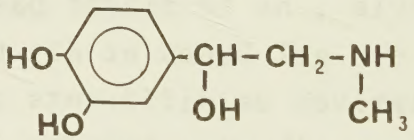
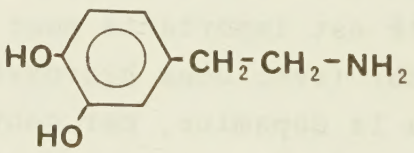
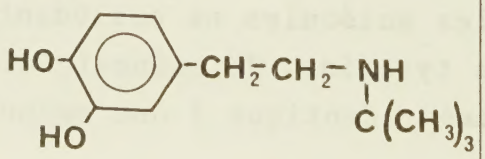
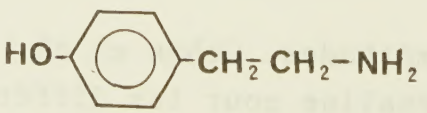
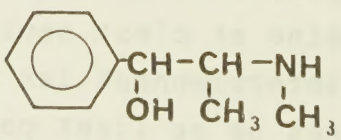
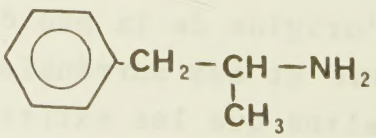
Plusieurs études sur les liaisons des catécholamines aux protéines plasmatiques ont montré que le noyau aromatique de la petite molécule était le site d'interaction.

Par électrophorèse appliquée à une série d'amines aromatiques dont l'adrénaline, la tyramine, l'éphédrine et l'amphétamine (formules au tableau 1), Y. Cohen et al. [1] ont démontré que la fonction alcoolique n'est pas nécessaire à la liaison puisque la tyramine se fixe, alors que le groupement phénolique semble jouer un rôle prédominant puisque l'amphétamine et l'éphédrine amines aromatiques ne possédant pas de groupement hydroxyle , ne se fixent pas.

Par filtration sur gel Danon et al. [2] ont donné un tableau des affinités relatives de différents analogues des catécholamines pour la sérum albumine humaine (tableau 1). On remarque que l'affinité est importante pour les molécules possédant un noyau catéchol (avec deux hydroxyles en ortho) comme la noradrénaline ou la dopamine, par contre l'affinité est très faible pour les molécules ne possédant qu'un noyau phénol simple comme la tyramine. Un aminoalcool (noradrénaline) a une capacité de liaison identique à une amine simple (dopamine).

Par les mêmes méthodes, Cohen et al. [3,4] ont précisé l'affinité de l'adrénaline pour les différentes fractions protéiques du sérum de lapin. Il semble que les sites préférentiels sont ceux de l'albumine et c'est seulement après la saturation de ceux-ci qu'interviennent les sites des α et β globulines. Les γ globulines ne se lient pas. L'importance de la liaison varie avec l'origine de la protéine : les extraits préparés à partir du cœur et des surrénales fixent deux à trois fois plus d'adrénaline que les extraits hépatiques.

Tableau 1 : Différents analogues des catécholamines

Nom	Formule	Affinité relative pour l'albumine du sérum humain 2
Phénol		2 ± 5
Catéchol		97 ± 4
Noradrénaline		100 ± 5
Adrénaline		104 ± 6
Dopamine		108 ± 12
Isoprénaline		-
Tyramine		3 ± 3
Ephédrine		4 ± 4
Amphétamine		-

Une controverse est survenue quand Zia et al. [5] à partir d'une étude sommaire par résonance magnétique du proton à 60 MMz, ont affirmé que la chaîne aliphatique de l'adrénaline était le site actif pour la sérum albumine bovine. Deux critiques sont à formuler sur ces résultats : Etant donné les limites apportées par l'appareillage à 60 MHz, il n'est pas possible de détailler le noyau aromatique. La méthode basée sur la mesure des élargissements de raie n'est pas précise. Nous verrons par la suite que l'interprétation des résultats ainsi obtenus doit être effectuée avec la plus grande prudence.

Pour palier à ces deux inconvénients et répondre au problème ainsi soulevé, nous avons entrepris une étude de ce même complexe par R.M.N. du proton à 90 MHz et à 250 MHz en utilisant deux méthodes de mesure des temps de relaxation : l'élargissement de raie et la transformée de Fourier.

b. Nos recherches

Dans un premier temps, nous avons vérifié les données obtenues par électrophorèse et nous avons évalué de manière approximative par ultrafiltration la constante de liaison du complexe Adrénaline (AD) - sérum albumine humaine (HSA).

Les études de R.M.N. ont débuté par la détermination des données spectroscopiques en résonance du proton et en résonance du carbone 13. Elles se sont poursuivies par l'étude des temps de relaxation T_2 en résonance du proton et des temps de relaxation T_1 en résonance du proton et du carbone 13. Finalement elles ont abouti à la détermination d'un schéma structural de ce même complexe.

2. Rôle physiologique de l'Adrénaline

Les amines sympathomimétiques ont été découvertes par Barger et al. [6] en 1910 lors de recherches sur le concept humoral de la transmission des influx nerveux sympathiques. L'adrénaline en tant que médiateur de l'action des nerfs sympathiques était connue dès 1904. Ces auteurs [6] constatèrent que plus on se rapproche de la structure de l'adrénaline, plus

l'action sympathomimétique augmente et devient spécifique. Les conditions de cette activité étant la présence d'un noyau benzénique accompagné de deux hydroxyles phénoliques en position 3 et 4, d'une chaîne latérale à deux atomes de carbone et d'un groupement terminal aminé. La présence d'un groupe alcoolique sur la chaîne augmente encore cette activité.

D'après Beauvallet [7] la noradrénaline est présente dans tous les nerfs sympathiques et les organes auxquels ces nerfs aboutissent. Dans la plupart de ces tissus elle domine largement alors que l'adrénaline ne s'y trouve qu'en faible quantité sauf dans les glandes surrénales. Chez l'homme le rapport adrénaline-noradrénaline est de 5 à 9 % dans la chaîne sympathique, de 20 % dans le cœur, de 60 % dans les surrénales on trouve également un fort pourcentage de noradrénaline dans le cerveau.

Leur action se situe principalement au niveau du système cardiovasculaire : la noradrénaline a un rôle vasoconstricteur, l'adrénaline suivant le type de récepteur a un effet de constricteur ou de dilatateur des vaisseaux, au niveau de l'appareil respiratoire et au niveau du système nerveux central. En ce qui concerne l'adrénaline, son injection provoque chez l'homme inquiétude et tremblements.

Les effets de vasoconstriction et d'hypertension s'inversent quand le substituant du groupe aminé au lieu d'un hydrogène comme sur la noradrénaline devient un groupe alkyle avec au moins trois atomes de carbone comme dans le cas de l'isoprénaline (tableau 1).

La noradrénaline libérée en permanence par le nerf sympathique maintient dans l'organisme un tonus normal. L'adrénaline intervient quand un trouble se produit. Elle n'est déversée dans le sang que par à coups à partir de la surrénale.

Du point de vue médical, la noradrénaline présente plus d'avantages que l'adrénaline. Elle est d'ailleurs moins toxique que cette dernière.

Nous avons choisi d'étudier l'adrénaline en raison de la stabilité de ses solutions aqueuses. Avec la noradrénaline nous constatons rapidement l'apparition d'un précipité brun correspondant à la forme oxydée.

3. Considérations structurales sur l'Adrénaline

Du point de vue structural, l'adrénaline comme l'ensemble des catécholamines dérive de la phényléthylamine.

Par le calcul, Pullman et al. [8] décrit la configuration de ces molécules à partir des angles de torsion τ (figure 1) ; l'angle diédral entre les plans ABC et BCD est τ (ABCD). Pour $\tau = 0$ la conformation est dite cisplanaire ou synplanaire, pour $\tau = 60°$ elle est synclinale, pour $\tau = 120°$ elle est anticlinale. Le signe négatif correspond au sens trigonométrique en regardant dans la direction de l'axe de B vers C.

En ce qui concerne l'adrénaline les deux hydroxyles phénoliques sont supposés être dans le plan du cycle. Les angles φ_1 et τ_3 (figure 2) sont respectivement égaux à $-60°$ et $180°$. Seuls restent à définir les angles τ_1 et τ_2 (figure 2). La méthode PCILO (Perturbation configuration interaction using localized orbitals) donne trois minima : le premier avec $\tau_1 = 120°$ et $\tau_2 = 180°$ correspond à une conformation trans étendue pour laquelle l'azote est éloigné du cycle, le second avec $\tau_1 = -60°$ et $\tau_2 = -60°$ ainsi que le troisième avec $\tau_1 = 100°$ et $\tau_2 = -60°$ pour lesquels l'azote est dirigé vers le cycle correspondent à deux conformations repliées gauche. Du fait de l'interaction entre groupes amino et hydroxyle, la configuration gauche avec $\tau_1 = -60°$ est la plus probable.

A partir de données cristallographiques [9] plus précises Pullman [10] montre que la conformation trans a une énergie supérieure de 3 kcal/mole par rapport à la configuration gauche ($\tau_1 = -60°$, $\tau_2 = -60°$). La barrière entre les deux formes est de l'ordre de 5 kcal/mole. En réalité le cristal est en conformation trans et en solution aqueuse

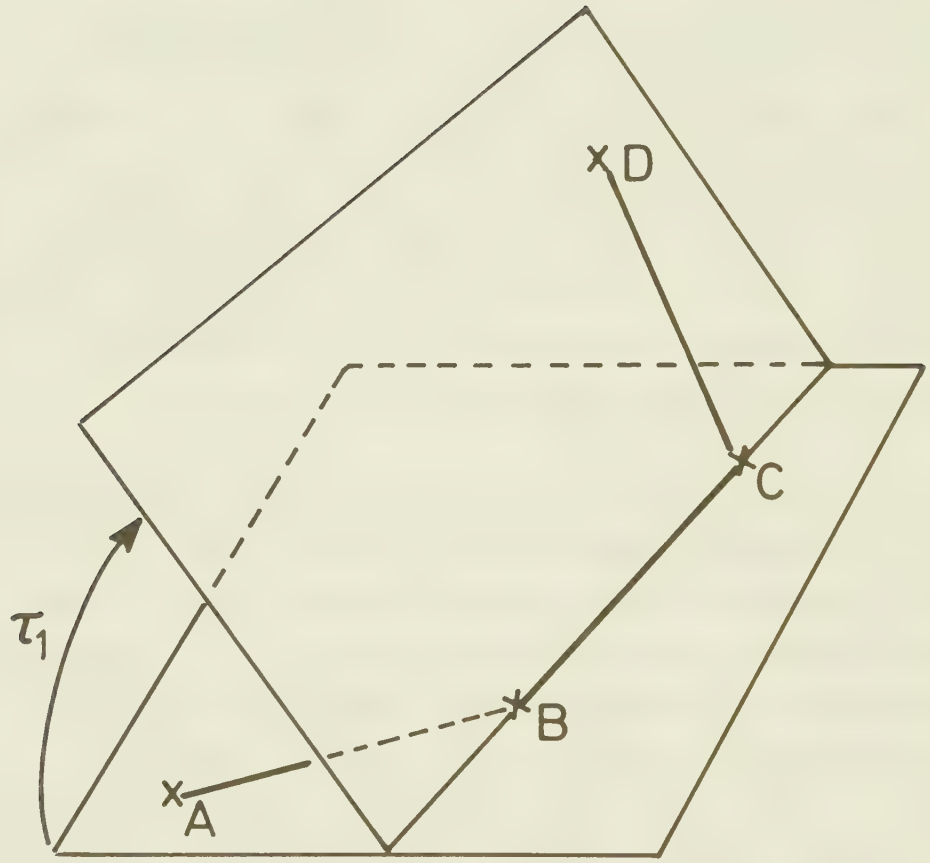


Fig. 1 : Définition de l'angle diedral (ABCD) ou angle de torsion τ.

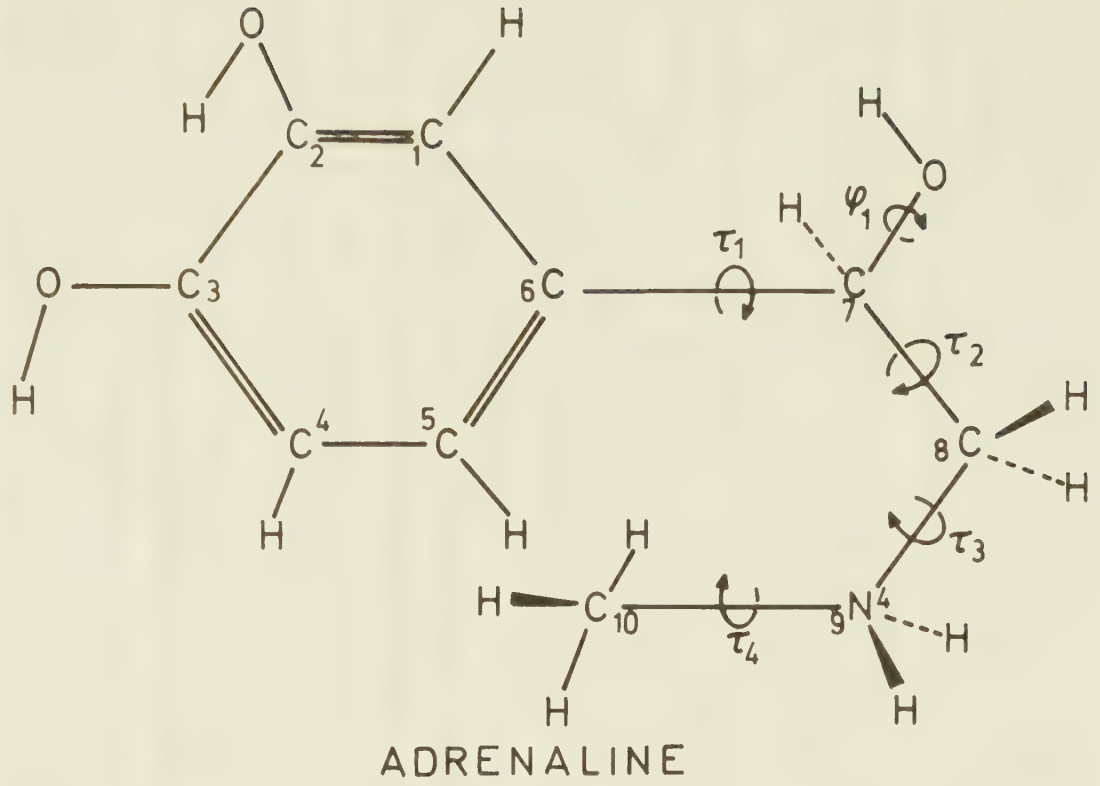


Fig. 2 : Représentation des angles de conformation pour l'adrénaline.

l'adrénaline se trouve sous forme d'un mélange de trans et de gauche avec prédominance de trans, ceci montre que les forces extérieures exercent une action particulièrement contraignante. Ces résultats sont également confirmés par le calcul ab initio.

Dans le cristal, il existe des liaisons hydrogènes auxquelles participent les groupes NH^+ et les groupes alcooliques et phénoliques. Il existe aussi des espèces ioniques correspondant au sel. Le tout se trouve en couches alternées de cations organiques hydrophiles et de groupes polaires appartenant au milieu. En solution les molécules d'eau jouent le même rôle que ces groupes polaires.

Nous constatons expérimentalement que pratiquement toutes les conformations observées pour les résidus α-aminés en solution ou dans les cristaux, tombent à l'intérieur de la zone de stabilité conformationnelle théorique. Cela indique que ni les molécules elles-mêmes, ni l'environnement n'imposent à ces résidus des conformations *extraordinaires* de hautes énergies. Elles choisissent uniquement entre les conformations de basses énergies autorisées. La R.M.N. permet d'étudier les conformations réelles existant en solutions. Nous discuterons plus loin des différents rotamères possibles pour l'adrénaline (voir annexe 1).

4. Importance de la liaison avec les protéines

Parmi les fonctions essentielles des protéines plasmatiques [11] il y a le maintien du taux de pression osmotique colloïdale, la balance électrolytique, le transport des ions métalliques, des acides gras, des stéroïdes hormonaux et des médicaments. C'est cette dernière fonction qui intéresse le présent travail.

La liaison protéine plasmatique-médicament a une importance pharmacologique considérable puisqu'elle permet d'expliquer le mécanisme d'action du médicament. L'interaction résulte d'un équilibre dynamique entre les molécules de médicament fixées sur les sites de liaison et celles qui sont libres dans la solution. C'est la forme dite libre qui est pharmacologiquement active et diffusible. Le type de la

liaison dépend de la structure moléculaire du médicament. Les changements dans la liaison protéinique plasmatique modifient la distribution du médicament dans l'organisme et par suite la cinétique de son métabolisme. L'effet sera d'autant plus important que la force de la liaison sera grande.

La liaison protéinique ralentit l'élimination du médicament, elle permet le stockage de molécules appelées à remplacer celles perdues au cours du métabolisme ou de l'excrétion.

Certaines combinaisons de médicaments aux protéines ont abouti à la formation d'antigènes capables de produire in vivo les anticorps correspondants [12]. Il est ainsi possible d'expliquer l'allergie à certains médicaments [13].

Il apparait donc particulièrement important de savoir dans quelles conditions la liaison existe, d'en calculer le taux et de connaître les groupements fonctionnels de la molécule qui se lient à la protéine.

La constante d'association K_a du complexe s'exprime à partir de la loi d'action de masse appliquée à l'équilibre :

$$P + M \rightleftarrows PM$$

M représente la concentration molaire de médicament non lié,
P est la concentration molaire en protéine libre et
nP la concentration molaire en sites de liaison occupés.

$$K_a = \frac{PM}{P.M}$$

K_a peut aussi s'exprimer en fonction des concentrations initiales, M_o et P_o de médicaments et de protéine

$$K_a = \frac{M_o - M}{M(nP_o - M_o + M)}$$

si α représente la fraction molaire de médicament lié :

$$K_a = \frac{\alpha M_o}{M_o(1-\alpha) \cdot (nP_o - \alpha M_o)}$$

L'interaction étant réversible, les résultats expérimentaux doivent être relatifs à l'équilibre complet.

D'autre part le pH joue un rôle important sur la stabilité de la liaison, c'est pourquoi dans les études in vitro il faut se placer le plus près possible des conditions physiologiques. In vivo le taux de liaison est maximum au pH sanguin égal à 7,4.

5. Différents types de liaisons avec les protéines

Le rôle des protéines sanguines est d'assurer le transport de diverses molécules tels les médicaments et les constituants du sang peu ou pas solubles dans l'eau. Le complexe établi avec la protéine bénéficie de l'extrême hydrophilie de la molécule protéique et devient soluble même s'il renferme une molécule insoluble.

Les forces de liaison susceptibles d'intervenir lors des associations des protéines avec les médicaments sont le plus souvent du type Van der Waals. Il peut également exister des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes. Les liaisons covalentes, formation d'une véritable combinaison chimique, ne sont que rarement envisageables dans le cas qui nous préoccupe. Les liaisons ioniques qui font intervenir les charges électriques inverses de deux groupements ionisés ne sont possibles qu'avec les groupements terminaux COO^- et NH_3^+ de la protéine. Là encore il s'agit d'une véritable combinaison chimique et le potentiel d'interaction est inversement proportionnel à la distance d'équilibre entre les deux atomes qui interagissent.

a. L'interaction de Van der Waals

Elle met en jeu des molécules neutres polaires ou non. Des fluctuations spontanées de charges dans le nuage électronique qui entoure un atome donné, créent des moments dipolaires momentanés qui polarisent l'atome voisin le plus proche. Les deux atomes sont donc momentanément attirés suivant une force proportionnelle à $1/r^6$, r étant la distance interatomique.

La description complète de l'interaction de Van der Waals exige de considérer en plus de l'attraction précédente la force de répulsion de non-contact qui l'équilibre. L'interaction totale est alors décrite soit par le potentiel de Buchingham :

$$V = -\frac{A}{r^6} + B\, e^{-\mu r}$$

soit par le potentiel de Lennard-Jones [14,15]

$$V = -\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}}$$

A est la constante de Pitzer, B est déterminé empiriquement à partir du potentiel total d'interaction de non liaison. μ peut être calculé expérimentalement par diffusion gazeuse. La valeur 4,6 peut être adoptée pour les molécules organiques à base de C, N, O, H.

D'après ces formules lorsque r augmente l'énergie de liaison commence par décroître, elle s'annule puis lorsque la distance entre les deux atomes est égale à la somme de leurs rayons de Van der Waals, elle passe par un minimum correspondant à la distance d'équilibre, elle devient ensuite très rapidement négligeable.

L'énergie de la liaison augmente avec la taille des atomes respectifs. Pour deux atomes de taille moyenne, elle n'est que de 1 Kcal/mole; l'énergie thermique moyenne des molécules à température ordinaire étant de 0,6 Kcal/mole. Les forces de Van der Waals ne sont donc efficaces aux températures physiologiques que si plusieurs atomes d'une molécule sont liés à plusieurs atomes d'une autre molécule.

Les interactions de contact les plus fortes ont lieu lorsqu'une molécule possède une cavité dont la forme est exactement complémentaire de celle d'un groupe protubérant d'une autre molécule.

b. la liaison hydrogène

Elle implique la présence simultanée d'un proton acide et d'un accepteur basique au sens de Lewis.

L'atome d'hydrogène est engagé dans une liaison covalente et porte une charge positive. L'atome accepteur, le plus souvent N, O, S et les ions halogénures, est chargé négativement, il est lui aussi engagé dans une liaison covalente.

Dans les systèmes biologiques, la liaison hydrogène se forme le plus souvent entre les atomes O - H ou N - H. L'énergie de liaison varie entre 3 et 8 kcal/mole, les liaisons les plus fortes étant celles qui mettent en jeu la plus grande différence de charges entre atomes donneur et accepteur.

Contrairement aux liaisons de Van der Waals les liaisons hydrogène ont des directions très précises. Les liaisons covalentes dans lesquelles sont engagés les deux atomes donneur et accepteur sont sur le même axe que la liaison hydrogène. Si tel n'est pas le cas, l'énergie de liaison est beaucoup plus faible.

Les liaisons hydrogène sont plus spécifiques que les liaisons de Van der Waals puisqu'elles nécessitent la présence de molécules porteuses de groupes complémentaires accepteurs et donneurs d'hydrogène.

c. L'interaction hydrophobe

Cette interaction n'existe qu'en solution aqueuse. Elle est en quelque sorte le contraire de la liaison hydrogène. Les groupements non polaires des protéines ont une faible affinité pour l'eau et cherchent à diminuer leur contact avec les molécules d'eau en se rapprochant les uns des autres. Il y a en fait compétition entre l'affinité pour un ligand amphiphile et la tendance à l'autoassociation.

6. L'albumine du plasma

Son poids moléculaire déterminé par différentes méthodes varie de 61 500 à 78 300. Nous l'avons considéré comme étant de 70 000. Les résultats obtenus varient en raison de la formation de polymères et en particulier la formation d'un dimère.

Le tableau 2 compare les résultats obtenus par Spahr [16] et par Putnam [17] pour la détermination de la composition en aminoacides des albumines de différentes espèces animales.

Lors de ces déterminations on a pu démontrer l'existence de deux sortes d'hétérogénéités dans la molécule d'albumine purifiée. Les macrohétérogénéités sont mises en évidence par le fait que les échantillons contiennent environ un groupe sulfhydrile pour trois molécules. Ceci laisse supposer que le dimère se forme par l'intermédiaire de ponts disulfides. En fait il existe deux classes de dimères [18] l'une reste inaltérée au cours de la réduction par le β-mercapto-éthanol, l'autre se change en monomère lors du même traitement. Les microhétérogénéités sont dues à la présence de deux formes isomères de l'albumine, la forme N comm e "native" ou "normal" et la forme F comme "fast" en raison de sa grande mobilité électrophorétique à pH 4. L'existence de ces deux formes est liée au pH. A pH acide c'est la forme F qui est favorisée. La conversion entre les deux formes est totalement réversible, la transition se faisant entre pH 3,4 et pH 4,8 [17].

Dans le tableau 3 nous trouvons les séquences N-terminal et C-terminal proposées par Franglen [18] pour les albumines de différentes espèces animales.

La structure secondaire de la molécule a été étudiée par dispersion rotatoire.L'albumine présente deux effets Cotton, l'un positif à 233 nm, l'autre négatif à 198 nm. Suivant les auteurs, on trouve que 40 à 50 % [19] ou 50 à 65 % [20] des aminoacides ont une conformation α-hélicoïdale.

D'après Foster [21] l'albumine se compose de quatre sous-unités compactes et il explique ainsi son comportement variable en fonction du pH. A pH acide la molécule se présente dans une configuration étendue et les sous-unités sont liées par des ponts peptidiques. Au-dessus de pH 4, les sous-unités sont unies par liaisons hydrogène et par interactions hydrophobes, ce qui confère à la molécule une structure globulaire.

Tableau 2 : Amino-acides constituant une molécule d'albumine pour différentes espèces animales.

a - d'après F.W. PUTNAM [17]
b - d'après G. FRANGLEN [18]

a -

Amino acides	Homme	Boeuf	Chien
Lysine	59	61	62
Histidine	16	18	13
Arginine	25	24	24
Aspartique Acid	55	57	55
Treonine	29	34	24
Serine	25	28	27
Glutamique acid	83	79	88
Proline	31	29	33
Glycine	15	17	24
Alanine	60	49	64
Half-cystine	36	38	35
Valine	46	35	43
Methionine	6	4	4
Isoleucine	9	14	6
Leucine	64	65	68
Tyrosine	18	20	23
Phenylalanine	33	28	32
Tryptophane	1	2	1
	611	602	626

b -

	Homme		Boeuf	
	g/100 g	résidus/66 000 g	g/100 g	résidus/66 000 g
Gly	1,02	12	1,38	16
Ala	6,64	62	4,97	46
Val	6,23	41-42	5,47	36-37
Leu	10,30	60	10,54	62
Ile	1,38	8	2,40	14
Pro	3,79	26	4,40	30
Phe	6,73	30	5,95	27
Tyr	4,34	17-18	5,00	20
Try	0,29	1	0,57	2
Ser	2,52	19	3,43	26
Thr	3,77	24-25	5,25	34
Cys	5,70	37	5,59	36
Met	1,13	6	0,75	4
Arg	5,63	24	5,30	22-23
His	3,33	16	3,50	17
Lys	12,02	62	11,98	62
Asp	8,89	51	9,46	54
Glu	15,28	78-79	15,17	77-78
Amide NH_3	0,84	34-35	0,79	32-33
	98,99	608-613	101,11	617-621

Tableau 3 : Séquences C-terminal et N-terminal de l'albumine pour différentes espèces animales (d'après G. FRANGLEN [18]).

- Séquences C-terminal

homme ⟶ -Gly-Val-Ala-Leu-CO_2H

cheval ⟶ -Leu-Ala-CO_2H

chien ⟶ -Leu-CO_2H

mouton ⟶ -Ala-CO_2H

porc ⟶ -Gly-Ile-Leu-Ala-CO_2H

taureau ⟶ -(Glu,Ala,Cys,Cys,Glu)-Phe-Ala-Val-Glu-Gly-Pro-Lys-Leu-Val-Val-Ser-Thr-Gin-Thr-Ala-Leu-Ala-CO_2H

poulet, canard ⟶ -(Ser,Thr,Gly,Val,Leu)-Ala-CO_2H

dinde ⟶ -(Thr,Gly,Ala,Leu)-Val-CO_2H

- Séquences N-terminal

homme ⟶ H_2N-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Glu-Asn-Phe-Lys-Ala-Leu-Val-Leu-

cheval ⟶ H_2N-Asp-Thr-

porc ⟶ H_2H-Asp-Thr-Tyr-Lys-Ser-Glu-Ile-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asx-Leu-Gly-(Glx,Tyr)-Phe-Lys-Leu-Gly-Leu-Val-Gly-Ser-Arg-

taureau ⟶ H_2N-Asp-Thr-His-Lys-Ser-Glu-Ile-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Glu-His-Phe-Lys-Gly-Leu-Val-Leu-

poulet, canard, dinde ⟶ -H_2N-Asp-

Franglen [18] note que l'albumine peut se combiner avec toute une série de composés et ceci par changement de configuration. La modification des positions relatives des chaînes latérales de la molécule permettant à celle-ci de s'adapter à son substrat. Ceci s'opère d'autant plus facilement quand la région possède une faible structure tertiaire.

II - EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Elles ont pour but de mettre en évidence l'existence de la liaison in vitro et de donner une estimation de la constante de stabilité du complexe.

1. Electrophorèse sur cellogel

a - Matériel et méthode

Nous avons utilisé des molécules radiomarquées au carbone 14 (provenance : département des Radioéléments du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay).

Liste des échantillons étudiés :

F2 : DL-Adrénaline 14 C-7 (tartrate)
0,012 mCi/ml - 54 Ci/mole - $2,22.10^{-4}$ mole/l

F3 : DL-Amphétamine ^{14}C-7 (sulfate)
0,25 mCi/ml - 13,5 Ci/mole - $1,85.10^{-2}$ mole/l

F4 : Tyramine ^{14}C-2 (acétate)
0,024 mCi/ml - 50 Ci/mole - $4,80.10^{-4}$ mole/l

F5 : Dopamine ^{14}C-2 (tartrate)
0,013 mCi/ml - 50 Ci/mole - $2,60.10^{-4}$ mole/l

Il s'agit de solutions aqueuses des sels de ces molécules, le pH est voisin de 5,0. Un ml de solution est mis à incuber pendant 30 mn à la température ambiante avec de la sérum albumine humaine (MSA) ou de la γ globuline humaine (Gγ) (provenance : laboratoires FLUKA). Aux échantillons précédents ont été ajoutées les quantités suivantes de protéines :

F2 : 22 mg/ml HSA ou 23,5 mg/ml G γ

F3 : 28 mg/ml HSA ou 24 mg/ml G γ

F4 : 23 mg/ml HSA ou 24 mg/ml G γ

F5 : 29 mg/ml HSA ou 27 mg/ml G γ

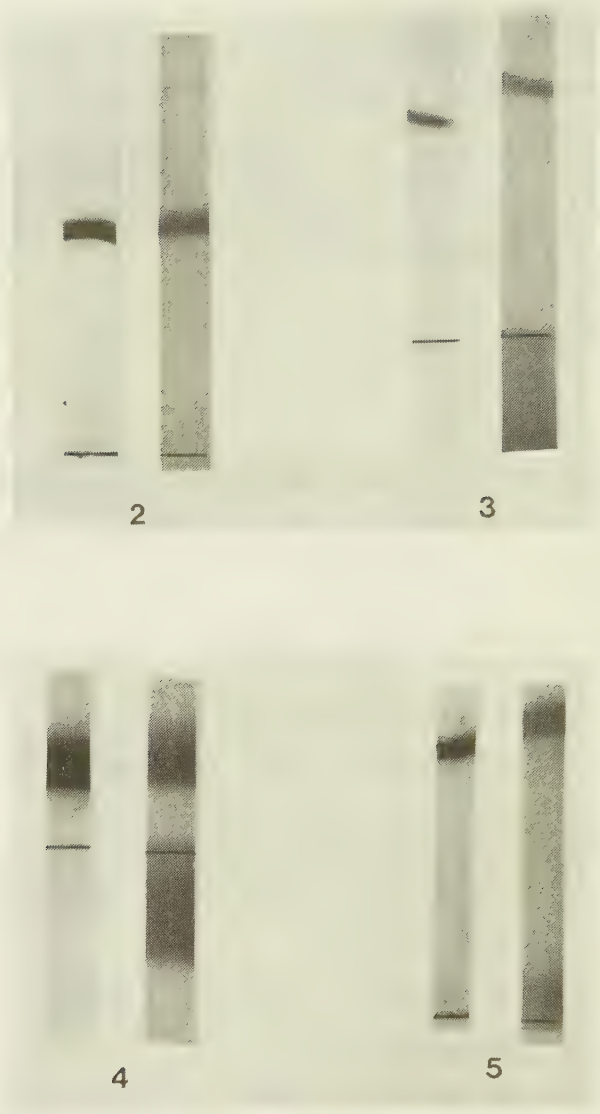
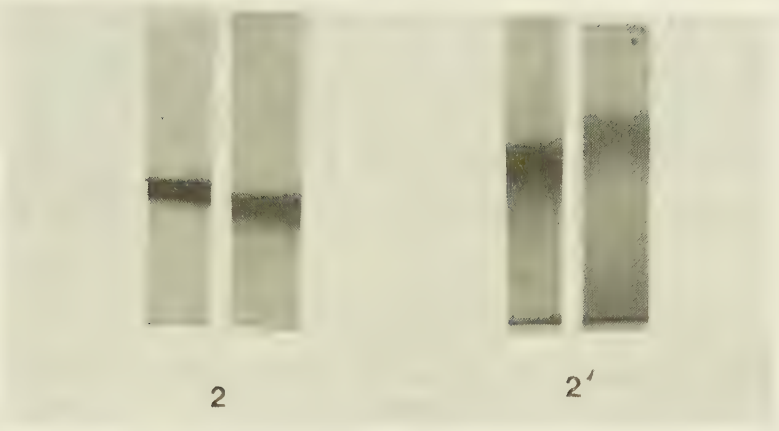


Fig. 3 : Electrophorèses effectuées sur les mélanges suivants :

2 - 1 ml de la solution F_2 d'adrénaline + 22 mg/ml d'HSA
3 - 1 ml de la solution F_3 d'amphetamine + 28 mg/md d'HSA
4 - 1 ml de la solution F_4 de tyramine + 23 mg/ml d'HSA
5 - 1 ml de la solution F_5 de dopamine + 29 mg/ml d'HSA

à gauche : coloration des protéines au Noir Amido
à droite : autoradiographie des molécules marquées

Les dépots ont été effectués en bas de la bande, côté anodique dans les cas 2 et 5, et au centre de la bande dans les cas 3 et 4.



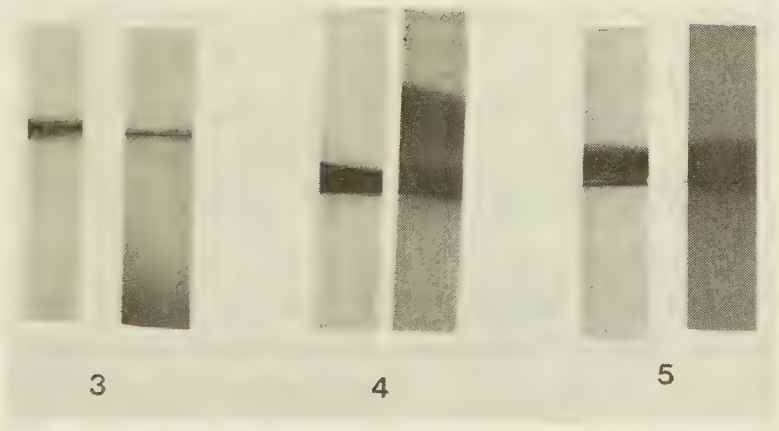


Fig. 4 : Electrophorèses effectuées sur les mélanges suivants :

2 et 2' - 1 ml de la solution F_2 d'adrénaline + 23,5 mg/ml de Gγ
3 - 1 ml de la solution F_3 d'amphétamine + 24 mg/ml de Gγ
4 - 1 ml de la solution F_4 de tyramine + 24 mg/ml de Gγ
5 - 1 ml de la solution F_5 de dapamine + 27 mg/ml de Gγ

à gauche : coloration des protéines au Noir Amido
à droite : autoradiographie des molécules marquées

Les dépôts ont été effectués au centre de la bande sauf dans le cas 2' pour lequel le dépôt a été fait en bas de la bande, côté anodique. La gamma globul ine migre très lentement. Les cas 2, 3, 4, 5 correspondent à un temps de migration inférieur au cas 2'.

Les solutions sont soumises à une migration électrophorétique dans une cuve de type KOHN, sur des bandes d'acétate de cellulose gélatineux, sous une tension de 160 V pendant 2 h 30 [22]. Le tampon utilisé (MERCK) se compose de barbital sodique, d'acétate de sodium et d'acide chlorhydrique 0,1 N en solution dans l'eau à pH 8,6.

A pH alcalin, les protéines migrent vers l'anode. Elles sont repérées par coloration au noir Amido en solution 5 mg/ml dans le solvant : Méthanol - acide acétique-eau (40-10-50).

Les bandes sont ensuite décolorées dans un bain diaphanisant :

Diacétone alcool	10
Méthanol	35
Acide Acétique	50
Eau	7

Après séchage à l'étude à 100 °C elles deviennent transparentes [22].

La présence de la molécule radioactive est décelée par mise en contact des bandes avec un film autoradiographique (KODIREX) pendant un mois à 4 °C. Une pulvérisation d'OMNISPRAY permet d'intensifier le rayonnement β du carbone 14 (156 Kev).

b - Résultats et discussion

La Figure 3 montre que l'adrénaline et la dopamine se lient à l'albumine. L'affinité paraît plus grande pour l'adrénaline, puisqu'à concentrations équivalentes il ne reste plus d'adrénaline en dépôt alors qu'il reste de la dopamine. La tyramine est l'amphétamine se lient partiellement. Une partie accompagne la fraction protéique dans sa migration, une autre partie reste en dépôt, enfin une troisième migre en direction de la cathode. Celle-ci correspond sans doute à la molécule chargée positivement et sous forme $^{-}NH_3^{+}$.

La figure 4 montre que l'affinité de l'adrénaline et celle de la dopamine sont beaucoup plus faibles pour la γ-globuline que pour l'albumine. A concentrations équivalentes il reste beaucoup plus de radioactivité en dépôt. La tyramine

se lie également de façon partielle, il en reste beaucoup au dépôt et une partie migre vers l'anode plus vite que la protéine. L'amphétamine ne se lie presque pas et la totalité migre vers la cathode sous forme de cation.

2. Ultrafiltration

a. matériel et méthode

Nous avons utilisé les mêmes solutions radioactives qu'au paragraphe précédent.

Une solution de 10 ml contenant 0,1 ml de solution initiale est mise à incuber 30 mn avec environ 0,3 % d'HSA. Le mélange est ensuite soumis à une filtration sous une pression de 3 bars dans une cellule AMICON (figure 5).

L'appareil se compose d'un réservoir sous pression, muni d'un agitateuretdans lequel se trouve la solution à filtrer ; d'une membrane (DIAFLO-UM10) de polymères anisotropiques non cellulosiques de grande résistance mécanique et chimique, dont les pores fins, de taille calibrée (seuil d'exclusion : poids moléculaire environ 20 000) réalisent la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme.

La membrane est placée sur un support poreux. On recueille le filtrat à la sortie de la cellule et la radioactivité de chacune des fractions (0,3 à 0,4 ml) est dosée par scintillation liquide en présence de 10 ml d'Instagel.

Le rendement du compteur est de 92,3 % et 2 220 000 dpm correspondent à 1 µci.

On trace ensuite la courbe donnant l'activité en fonction du volume filtré [23]. Le palier correspond à l'équilibre de formation du complexe protéine-petite molécule. La membrane se comporte en effet comme lors d'une dialyse et à l'équilibre il y a égalité des concentrations de petites molécules libres de part et d'autre de la membrane.

En raison de l'apparition de charges électrostatiques sur la membrane, il intervient un risque de colmatage, c'est pourquoi il faut travailler avec des solutions diluées de protéine

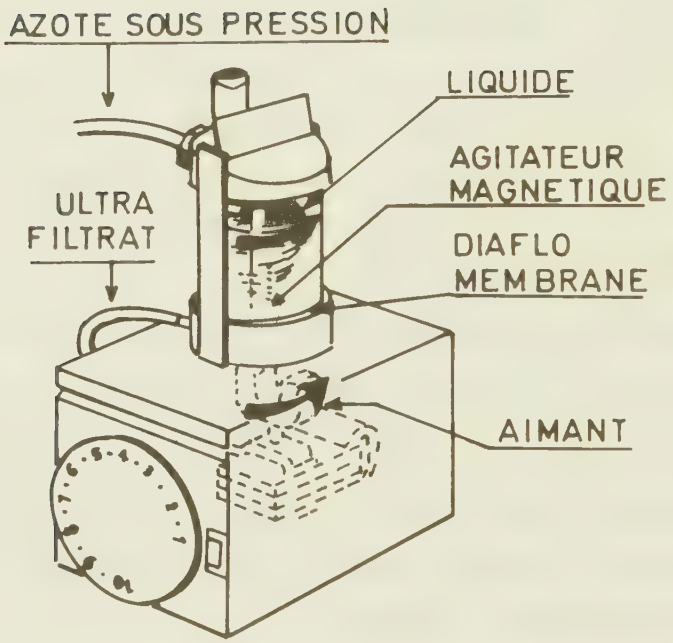


Fig. 5 : Cellule d'ultrafiltration.

[24], de faible pression et une agitation régulière. D'autre part il se crée des liaisons entre la membrane et la petite molécule, de sorte que la concentration de cette dernière au niveau de la membrane est plus grande que la concentration réelle à l'équilibre. Ce phénomène est surtout sensible aux faibles concentrations.

b. Résultats et discussion

L'expression du rapport molaire de molécule liée est donnée par [25]

$$r = \frac{Co - C}{Cp}$$

Co représente la concentration molaire initiale en petite molécule libre, C est la concentration molaire de celle-ci à l'équilibre, Cp la concentration molaire en protéine libre à l'équilibre.

Si l'on admet qu'il existe à faible concentration un seul site de liaison par molécule de protéine [26], r peut aussi s'exprimer en fonction de la concentration molaire initiale en protéine C_p^o

$$r = \frac{Co - C}{C_p^o - Co + C}$$

La constante d'association Ka du complexe est alors égale à :

$$Ka = \frac{r}{C}$$

L'ensemble des résultats se trouve au tableau 4 pour les solutions F2, F4, F5, d'adrénaline, de tyramine et de dopamine respectivement. C'est l'adrénaline qui a la plus grande affinité pour l'albumine ($k = 0{,}8.10^5$ 1/mole), soit environ 10 fois celle de la tyramine et 5 fois celle de la dopamine. Les valeurs trouvées ne sont pas en accord avec celles proposées par Danon et al. [2]. Ces auteurs trouvent des affinités similaires pour la dopamine et l'adrénaline et une affinité presque nulle pour la tyramine (tableau 1). Ces mêmes auteurs trouvent des constantes d'association de l'ordre de 10^7 1/mole pour la noradrénaline.

Tableau 4 : Résultats obtenus par ultrafiltration des solutions de dopamine, de tyramine et d'adrénaline radiomarquées au C-14

C_o : concentration initiale en molécule marquée

C : concentration en molécule libre à l'équilibre

C_p^o : concentration initiale de protéine

C_p : concentration de protéine à l'équilibre

K_d : constante de dissociation du complexe

K_a : constante d'association du complexe

	Dopamine	Tyramine	Adrénaline
C_o (µmole/l)	2,6	4,8	2,2
C (dpm)	65 000	114 000	30 000
C (Ci/l)	$0,075.10^{-3}$	$0,185.10^{-3}$	$0,025.10^{-3}$
C (µmole/l)	1,5	3,7	0,5
C_o-C (µmole/l)	1,1	1,1	1,7
C_p^o (g/l)	3,19	3,24	3,07
C_p^o (µmole/l)	45,6	46,3	43,9
C_p (µmole/l)	44,5	45,2	42,2
K_d	60.10^{-6}	148.10^{-6}	12.10^{-6}
K_a	16.10^3	7.10^3	80.10^3

Dans le cas de la sérum albumine bovine, Rodriguez [26] donne 9.10^5 l/mole pour les sites de premier ordre et 7.10^4 l/mole pour les sites de second ordre. Nos valeurs ne sont établies qu'à titre comparatif des affinités relatives des différents substrats pour l'HSA ; elles ne portent que sur une seule expérience. Il semble d'après [26] qu'elles sont relatives aux sites du second ordre.

En ce qui concerne l'amphétamine, la même expérience réalisée avec la solution F 3 ne donne pas sur la courbe, de palier apparent qui correspondrait à l'équilibre. Nous pouvons en déduire que le complexe ne se forme pas ou du moins qu'il se dissocie au fur et à mesure.

Ces divers résultats confirment ceux obtenus précédemment par électrophorèse.

III - APPLICATIONS DE LA RMN A L'ETUDE DES LIAISONS MEDICAMENTS-PROTEINES

1. Généralités sur la RMN

Un noyau de spin I possède un moment cinétique I. Cette rotation du noyau sur lui-même crée un moment magnétique nucléaire μ. Ce noyau, placé dans un champ magnétique H_o, a son énergie quantifiée en 2 I + 1 niveaux dont les énergies diffèrent de

$$E = \frac{\mu Ho}{I}$$

En appliquant un champ radiofréquence H_1 tel que

$$\nu_1 = \frac{\gamma \, Ho}{2 \, \pi}$$ (γ facteur gyromagnétique du noyau)

il est possible d'induire des transitions entre les sous-niveaux. C'est cette absorption d'énergie qui sera détectée en RMN [27].

En général les spectres de RMN présentent un ou plusieurs multiplets de résonance dont chacun possède 4 caractéristiques :

- l'abscisse
- l'aire comprise sous son enveloppe
- la multiplicité des raies qui le composent
- la largeur des pics à mi-hauteur

Examinons succinctement chaque caractéristique :

Le noyau est soumis, du fait de son environnement électronique, à un champ Ho (1 - σ) où σ est la constante d'écran, variant suivant l'atome. Cette variable est à l'origine du déplacement chimique, δ, qui dépend de la position du noyau dans la molécule.

Le nombre de noyaux équivalents résonnant à une même fréquence est proportionnel à l'aire comprise sous le pic de résonance. Le champ magnétique auquel est soumis un noyau est influencé par les spins des noyaux voisins, la raie observée présentera donc une structure fine dûe aux couplages ^{1}H-^{1}H dans le cas de la résonance du proton et aux couplages ^{13}C-^{13}C et ^{13}C-^{1}H dans le cas de la résonance du carbone 13. Les couplages C - C ne seront observables que pour des molécules enrichies en ^{13}C. En RMN du carbone 13 les couplages C-H et H-H peuvent être supprimés par double résonance. Ce découplage simplifie les spectres ce qui donne lieu à des applications intéressantes.

Après l'absorption d'énergie par résonance magnétique le phénomène de relaxation provoque le retour à une distribution de Boltzman : le temps de relaxation caractérise la cinétique d'évacuation de l'énergie du système de spins vers le réseau (T_1 : relaxation longitudinale) ou vers le système lui-même (T_2 : relaxation transversale) . Le temps de relaxation longitudinal T_1 est mesuré indirectement par spectroscopie d'impulsion suivie de transformation de Fourier. Le temps de relaxation transversal T_2 est mesuré directement sur les spectres à partir de la largeur de raie à mi-hauteur [28] à l'aide de la relation :

$$\delta \left(\nu \tfrac{1}{2}\right) = \frac{1}{\pi T_2}$$

Quand il y a interaction entre deux molécules, le spectre de chacune d'elle se trouve modifié. En faisant varier la concentration en protéine réceptrice et en suivant l'évolution des déplacements chimiques, des couplages ou des temps de relaxation il est possible de localiser le site de liaison sur le ligand. Le changement observé dépend de la vitesse d'échange. Si la vitesse d'échange est lente chaque état est nettement séparé, si elle est rapide on observe la moyenne entre les deux états existants. Quand les deux états ne diffèrent que par les temps de relaxation et dans le cas d'un échange rapide, on utilise la relation [29] :

$$\left(\frac{1}{T}\right)_{obs.} = \alpha \left(\frac{1}{T}\right)_{lié} + (1-\alpha) \left(\frac{1}{T}\right)_{libre}$$

qui donne la valeur de T_1 ou T_2 observée en fonction de la fraction α de molécule liée et des valeurs de T_1 ou T_2 pour les molécules totalement libres dans la solution ou totalement liées à la protéine. Dans tous les cas il est nécessaire de s'assurer que la variation observée est bien spécifique.

2. Mesures de T_1 par transformation de Fourier

La R.M.N. par transformation de Fourier [30] diffère de la R.M.N. en balayage continu. Elle consiste à exciter simultanément toutes les fréquences correspondant à la largeur de bande spectrale. L'impulsion dure quelques microsecondes.

Le moment magnétique du noyau bascule suivant un angle qui dépend de la durée de l'impulsion. L'aimantation transversale décroît ensuite au cours du temps et le signal détecté est l'interférogramme, somme des exponentielles amorties correspondant à tous les spins en présence.

La transformée de Fourier fait passer de la fonction cause ou aimantation (dans l'espace temps) à la fonction effet ou absorption spectrale (dans l'espace fréquence) :

$$F = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-i\omega t} \, dt$$

Dans le cas de fonctions complexes, la transformée de Fourier existe, même si x n'est pas périodique. Seul un calculateur permet de passer de l'espace temps à l'espace fréquence. Dans la réalité, le temps d'acquisition du signal après l'impulsion a une durée finie.

Pour la mesure des temps de relaxation on utilise une séquence d'impulsions parmi les deux suivantes (figure 6) :

a) $(180° - t - 90° - D)_n$ = méthode d'inversion-recouvrement

b) $(90° - t)_n$ = méthode de saturation progressive

t représente le temps pendant lequel la molécule relaxe, D est le temps d'attente entre deux séquences d'impulsions et n le nombre de fois que l'on répète la séquence. Il existe d'autres séquences possibles que nous ne détaillerons pas ici. L'intensité S(t) du signal est définie en fonction de t et de T_1 :

a) $S(t) = S_\infty \cdot (1 - 2\, e^{-t/T_1})$

b) $S(t) = S_\infty \cdot (1 - e^{-t/T_1})$,

S_∞ représentant le signal transformé après relaxation complète au bout d'un temps indéfini, S(t) s'annule pour $t = T_1 \text{ Log } 2$ et $t = T_1$ respectivement pour les deux séquences a et b.

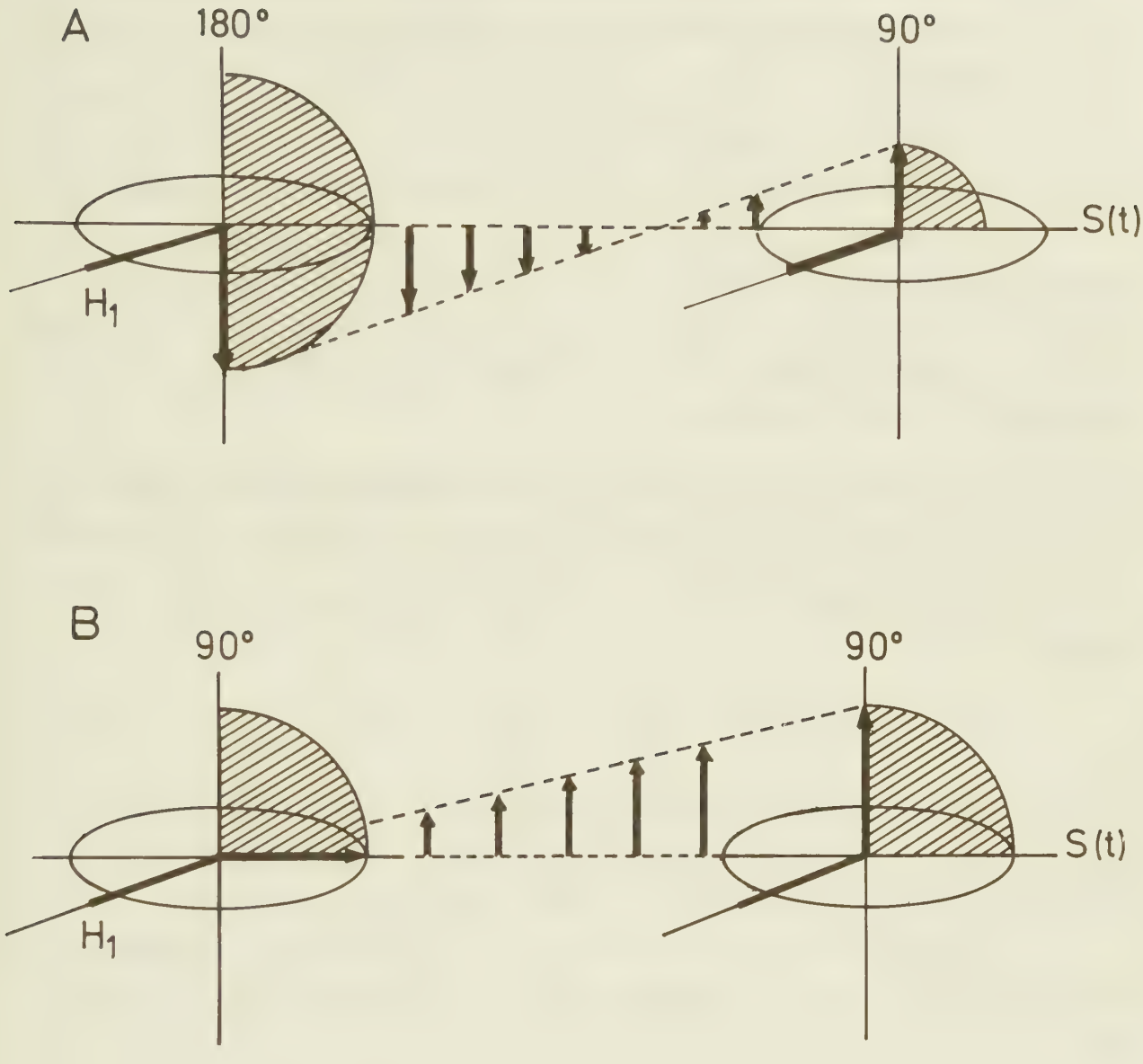


*Fig. 6 : **Mesure** des temps de relaxation*

A : par la méthode d'inversion recouvrement

B : par la méthode de saturation progressive

3. Interprétation des résultats

Le temps de relaxation d'un proton diminue quand celui-ci se trouve immobilisé par une interaction moléculaire au niveau d'un groupement fonctionnel voisin. En étudiant la variation de T_1 ou T_2 en fonction du rapport des concentrations de médicament et de protéine, pour chaque proton il sera possible de localiser le ou les sites de la liaison sur la molécule de médicament.

La mesure de T_2 qui est directement reliée à la largeur de raie ne donne pas toujours des résultats reproductibles en raison de la variation aléatoire de l'homogénéité de l'appareil [31]. Le champ magnétique est en effet très sensible aux fluctuations de l'environnement.

Le temps de relaxation T_1 facilement mesurable quand on dispose d'un spectromètre équipé de la transformée de Fourier, donne des résultats plus précis. De plus il se trouve que T_1 est d'une interprétation plus aisée que T_2 puisque d'après la relation (32) :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1\rho}} + \frac{1}{T_{1D}} + \frac{1}{T_{1E}} + \frac{1}{T_{1\sigma}}$$

à contribution paramagnétique E constante, sa variation n'est dûe qu'aux contributions intra-(ρ) et inter-(D) moléculaires, σ réprésentant l'anisotropie magnétique de la molécule.

T_2 par contre fait intervenir des termes de relaxation scalaire S ainsi que l'inhomogénéité du champ magnétique appliqué :

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2\rho}} + \frac{1}{T_{2D}} + \frac{1}{T_{2E}} + \frac{1}{T_{2\sigma}} + \frac{1}{T_{2S}} + \frac{\gamma}{2\pi} \Delta H$$

γ représente le facteur gyromagnétique des protons.

D'autre part la valeur de T_1 permet d'atteindre le temps de corrélation τ_c de la molécule [33]. Il correspond au temps moyen de réorientation de celle-ci. Dans les liquides, il se ramène à un terme de diffusion et τ_c est le temps écoulé entre 2 collisions. Plus le temps de corrélation est long, plus le temps de relaxation est court et moins la molécule est mobile.

La fonction de corrélation G relie l'ensemble des spins de la molécule à un instant donné τ. La transformée de Fourier donne la fonction J de répartition ou densité spectrale :

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} \, d\tau$$

avec $G(\tau) = \exp(-|\tau| / \tau_c)$

Le temps de relaxation longitudinal est inversement proportionnel à J

$$\frac{1}{T_{1\rho}} \simeq 2 \langle H^2 \rangle \tau_c$$

$\langle H^2 \rangle$ étant une fonction elle-même inversement proportionnelle à la puissance sixième des distances internucléaires.

IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX EN RMN DU PROTON.

1. Données spectroscopiques.

a) Différents paramètres spectroscopiques de l'adrénaline et de molécules apparentées (voir Annexe 2).

b) Etude de la simulation de la région aromatique du spectre de l'amphétamine.

Le spectre expérimental du noyau aromatique de l'amphétamine étant particulièrement complexe il n'est pas possible d'utiliser directement le programme LAOCN3 (voir paragraphe a)) pour déterminer les différents paramètres spectroscopiques. Pour la molécule à 7 spins le spectre théorique calculé comporte environ 3000 transitions. On comprend dès lors que l'attribution des fréquences calculées aux fréquences expérimentales présente quelques difficultés, compte tenu du manque de résolution du spectre expérimental. Nous proposons ici une nouvelle procédure de simulation adaptable à chaque cas expérimental (voir Annexe 1).

2. Etude des temps de relaxation T_1 de la molécule d'adrénaline en présence de sérum albumine humaine.

La présence de la protéine dans la solution ne change ni les déplacements chimiques ni les couplages spin-spin de la molécule d'adrénaline. Par contre, on observe un élargissement important et variable suivant les pics ; ce qui témoigne d'un changement dans la relaxation et de l'existence d'une interaction spécifique. On peut déduire de ces observations que la formation du complexe ne se traduit pas par une

variation de la conformation, ni des distances internucléaires. Dans ce cas le temps de relaxation est inversement proportionnel au temps de corrélation de la molécule [32], il rend compte directement du degré d'immobilisation par interaction moléculaire. Afin de préciser le type de la liaison et le site d'interaction sur l'adrénaline nous avons entrepris l'étude par RMN à haut champ de la variation du temps de relaxation T_1 des protons de la molécule en solution aqueuse en présence de quantités croissantes de sérum albumine humaine.

a) Matériel et méthodes.

L'adrénaline (AD) sous forme basique provient des laboratoires K & K et la sérum albumine humaine (HSA) cristallisée à pH5,1 est garantie pure à 100% par les laboratoires Fluka. Une immuno-électrophorèse nous a permis de confirmer cette pureté. La quantité de cuivre contenue dans la protéine a été dosée par analyse par activation, elle est de 23 µg de Cu par g d'albumine ce qui représente environ 25.10^{-3} mole de Cu par mole d'HSA. Les solutions utilisées contiennent donc 23.10^{-2} µg de Cu pour 1% d'HSA ce qui ne doit en rien perturber le spectre RMN. En effet SYKES [31] a montré que la présence de 3.10^{-4} M de Cu produit un élargissement de raie de 20% seulement. Dans notre cas, les concentrations en albumine sont toujours inférieures à 5% ce qui représente pour une masse molaire de 70 000 une solution $7\ 10^{-4}$ M en HSA et par conséquent $1,75\ 10^{-5}$ M en Cu.

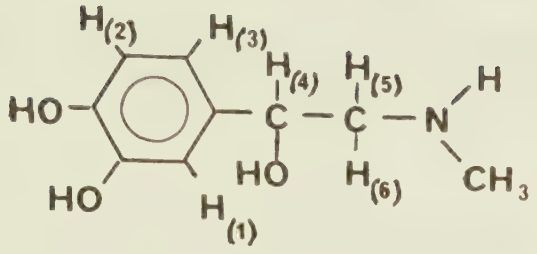
L'adrénaline est mise en solution à pH acide, voisin de 1,0 dans D_2O+DCl. Un peu de sulfite de sodium est ajouté afin d'éviter l'oxydation. Le pH est ajusté à une valeur proche de 5,0 par addition de NaOD. L'albumine est ensuite ajoutée à la solution sous forme cristallisée. La valeur de pH 5,0 a été choisie parce qu'elle évite l'oxydation de l'adrénaline en milieu basique ainsi que sa précipitation en milieu acide ; de plus la dissolution de la protéine se trouve facilitée. Il a été préparé des solutions de différentes concentrations allant jusqu'à 5% d'HSA. Au-delà de cette valeur les spectres de l'adrénaline sont difficilement lisibles.

Les mesures des temps de relaxation T_1 ont été effectuées à 22°C sur un spectromètre à 250 MHz Cameca TSN 250 équipé de la transformation de Fourier (programme T_1CAM). Pour un champ H_1 = 50 dB l'impulsion à 90° était de 11°5 µsec. La raie de l'eau a été supprimée

ou fortement diminuée par double irradiation : Champ de découplage H_2 = 18 dB. La fréquence d'impulsions utilisées est 180°-t-90°. Un calculateur Nicolet couplé au spectromètre permet le stockage sur disque des interférogrammes (free induction decay: FID) pour différentes valeurs de t . Les données stockées sont ensuite traitées par l'ordinateur. Elles permettent de tracer les courbes donnant l'intensité d'un pic en fonction de τ. L'amplitude S_t du signal est donnée par la formule $S_t = S_\infty (1-2\ e^{-t/T_1})$, elle s'annule pour $t = T_1$ Log 2. Le temps de relaxation a ainsi été déterminé pour six pics du spectre de l'adrénaline : trois pics pour les protons du noyau aromatique, trois pics pour les protons de la chaîne aliphatique, comme le montre la figure 7. Quand c'est un multiplet qui correspond dans le spectre à la résonance d'un proton déterminé nous avons vérifié que les variations de T_1 pouvaient être mesurées sur un seul pic significatif de ce multiplet. Ce pic a été pointé sur la figure. Pour le proton aromatique H_3 le pic de haute fréquence ayant la plus grande intensité, il paraîssait évident de le choisir. Le pic central du triplet relatif à CH-OH a été retenu pour la même raison. Dans le cas du groupe éthylénique CH_2, le pic haute fréquence se dédouble quand le pH est voisin de 5,0 et il nous a donc paru plus habile de sélectionner le pic de basse fréquence dont l'amplitude est d'ailleurs plus élevée.

Le pic de basse fréquence du proton H_2 est parfaitement isolé du reste du massif et peut être identifié sans problème, contrairement à H_1. Le pic n° 1' du fait de la proximité du pic haute fréquence du doublet relatif à H_2 a une intensité plus grande en valeur absolue que celle qu'il a en réalité. Cette intensité est positive et croît quand t croît par valeur supérieure à T_1, mais elle est négative et décroît quand t décroît par valeur inférieure à T_1 ; en conséquence la valeur trouvée pour T_1 ne se trouve pas modifiée.

En présence d'HSA il n'est plus possible de distinguer les pics 1 et 1', la hauteur mesurée sera celle du pic enveloppe (Fig. 8). Nous avons en effet constaté qu'en absence d'HSA les T_1 calculés pour les pics 1 et 1' pris séparément sont identiques et supérieurs à la valeur correspondante du pic 2 ; il y a donc tout lieu de penser que le pic enveloppe des pics 1 et 1' relaxe de la même manière que le pic 1'. D'autre part la variation importante de T_1 en fonction du pourcentage d'HSA pour le pic enveloppe des pics 1 et 1' est bien due au seul proton H_1 puisque dans les mêmes conditions T_1 correspondant au proton H_2 ne varie que très faiblement.



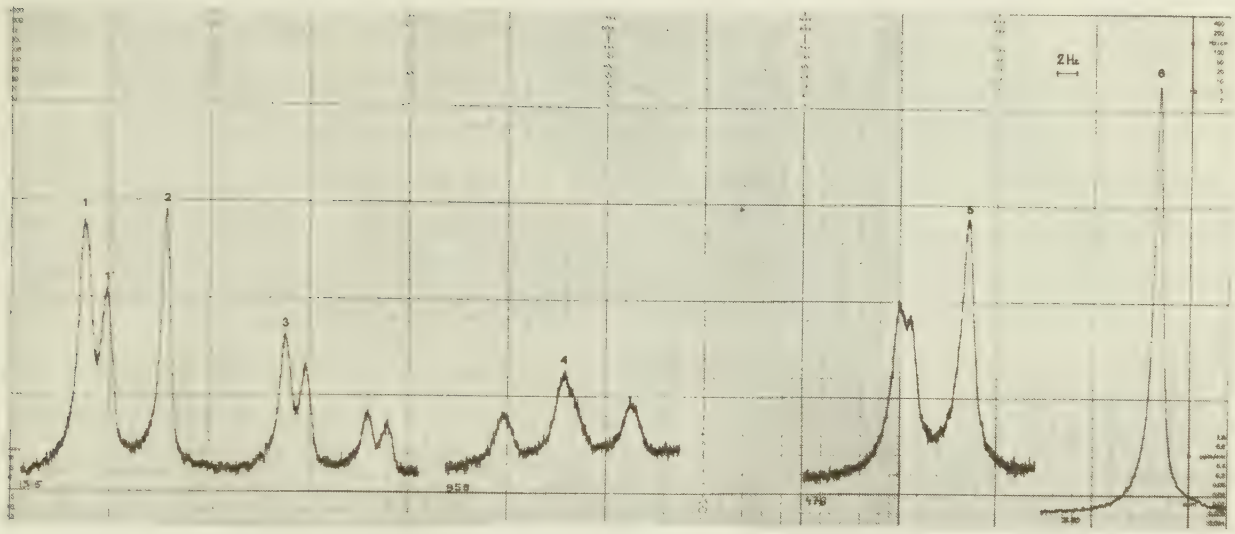


Fig. 7 : Pics sélectionnés pour la mesure des temps de relaxation T_1 des différents protons de la molécule d'adrénaline.

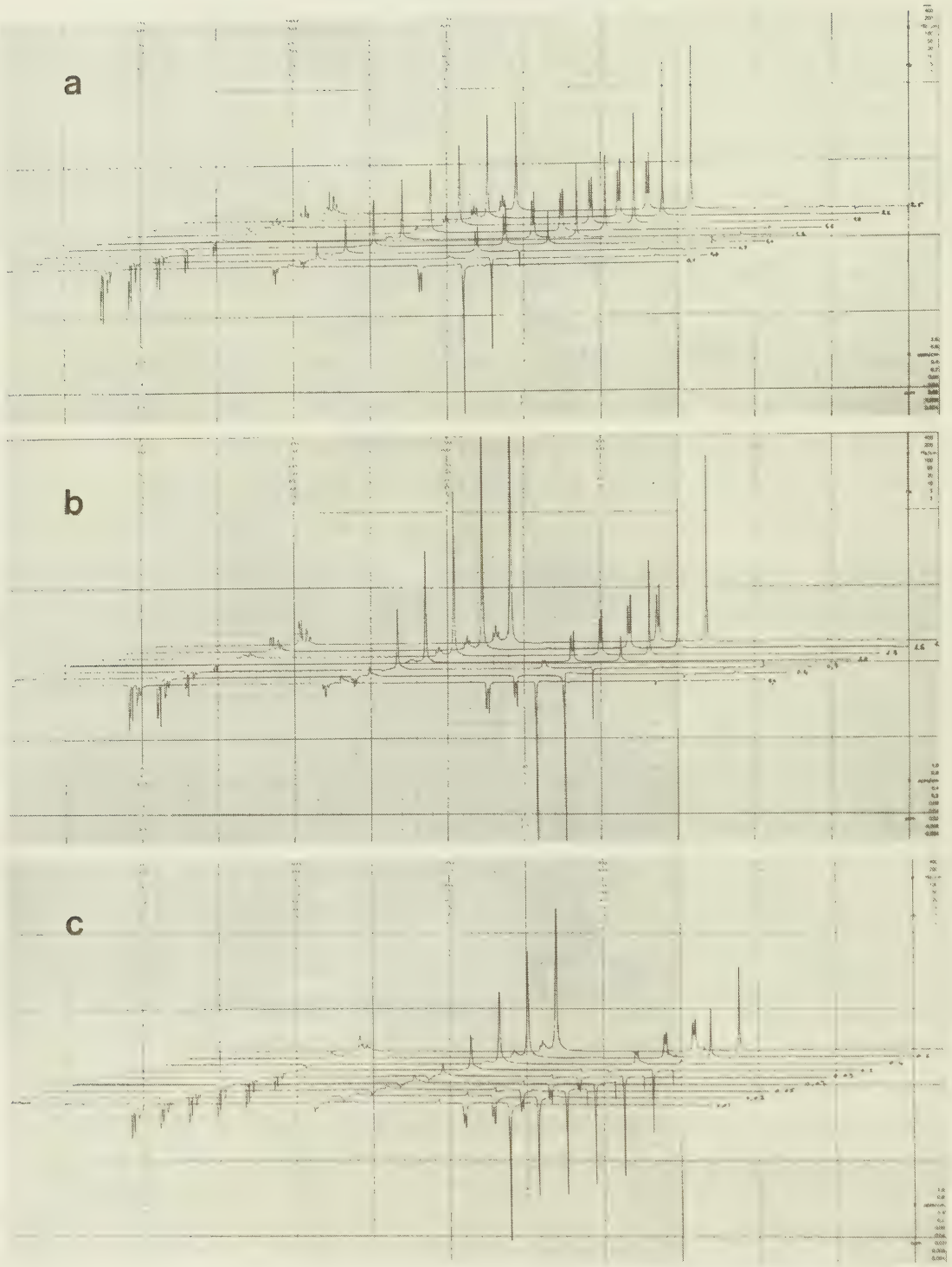


Fig. 8 : Spectres de Relaxation T_1
largeur spectrale 2000 Hz
solution 0,11 M d'adrénaline dans D_2O à p^{H*} 5,24

a - 0% d'albumine
b - 1% d'albumine
c - 2,8% d'albumine

Les pentes des droites donnant $1/T_1$ en fonction de la concentration d'albumine ou en fonction de l'inverse de la concentration d'adrénaline ont été calculées sur IBM 360 par un programme FORTRAN IV basé sur la méthode des moindres carrés (voir Annexe 3). Les valeurs de $1/T_1$ pour les courbes à concentration fixe d'albumine ont été déterminées expérimentalement pour des concentrations voisines de 1 et 2% d'HSA et extrapolées linéairement aux valeurs entières.

b) Résultats et discussion.

Nous avons étudié pour l'ensemble des protons de l'adrénaline la variation de $1/T_1$ en fonction de la concentration d'HSA, ceci pour des solutions 0,05 M, 0,1 M et 0,25 M d'AD contenant de 0 à 4% d'HSA. La diminution du temps de relaxation T_1 quand la concentration de protéine augmente, est reportée sur les figures 9, 10 et 11, si l'immobilisation n'était due qu'à une augmentation de viscosité, la pente de la droite serait la même pour tous les protons de la molécule. Si, par contre, cette immobilisation est due à l'interaction spécifique avec la protéine, les droites $1/T_1$ se différencieront selon la distance du proton correspondant au site de liaison. Or, nous observons (fig. 9 et 10) que le proton aromatique H_1 voisin des hydroxyles du noyau catéchol et le proton du groupement alcoyle CH-OH subissent avec l'approche de la molécule d'albumine une influence plus grande que les autres protons. Les pentes des droites relatives aux protons H_2 et H_3 du noyau aromatique, de même que celles relatives aux protons des groupes éthyle et méthyle sont faibles et du même ordre de grandeur. Pour ces derniers la variation de T_1 n'est due qu'à l'augmentation de viscosité de la solution.

En l'absence de protéine une étude de la variation de $1/T_1$ en fonction de la concentration d'adrénaline nous montre que pour des concentrations inférieures à 0,20 M d'AD, T_1 ne varie que très peu. Comme l'indique la figure 12 et le tableau 5 au-dessus de 0,20 M d'AD T_1 diminue quand la concentration d'AD augmente et ceci en raison du phénomène d'auto-association des petites molécules entre elles.

On constate (fig. 13) que pour des solutions de 0,05 M à 0,10 M d'AD en présence de 1,47% d'HSA, $1/T_1$ décroît quand la concentration d'adrénaline augmente. Nous démontrons alors que le temps de relaxation T_1 croît quand le rapport $[HSA]/[AD]$ augmente et que la variation est significative d'une interaction spécifique entre l'albumine

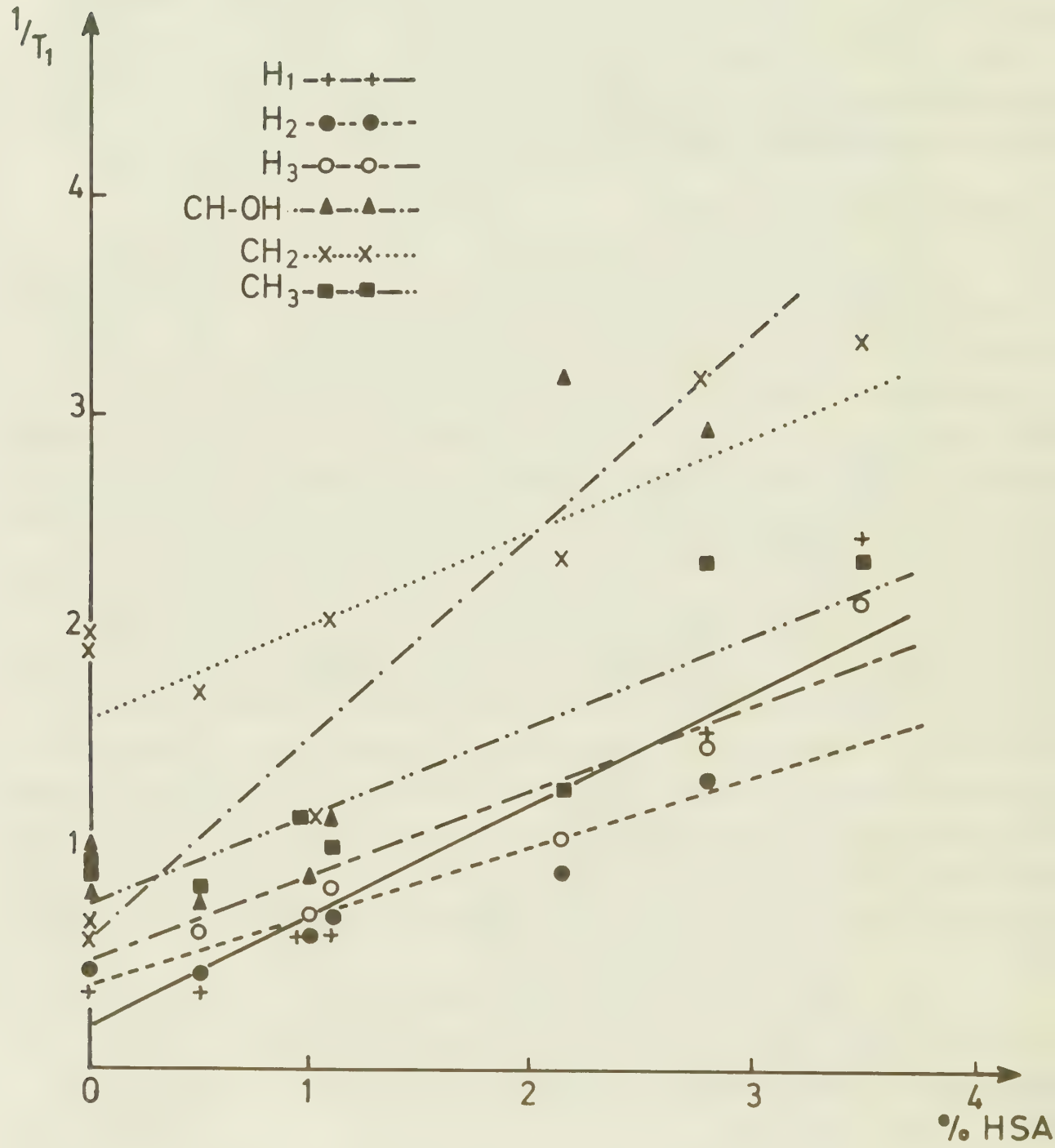


Fig. 9 : Variation de 1/T 1 en fonction de la concentration d'albumine pour une solution 0,10 M d'adrénaline.

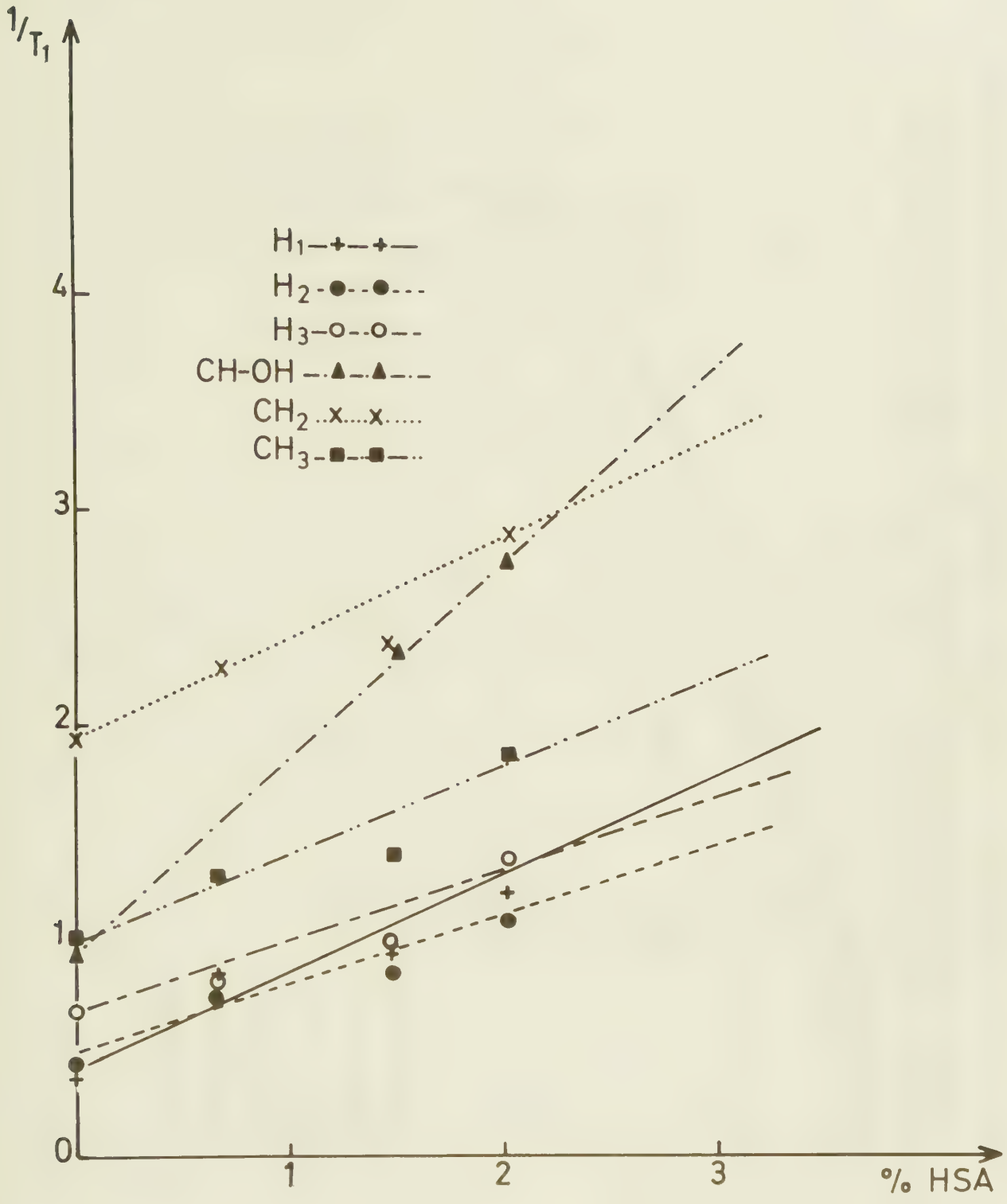


Fig. 10 : Variation de $^{1}/T$ 1 en fonction de la concentration d'albumine pour une solution 0,05 M d'adrénaline.

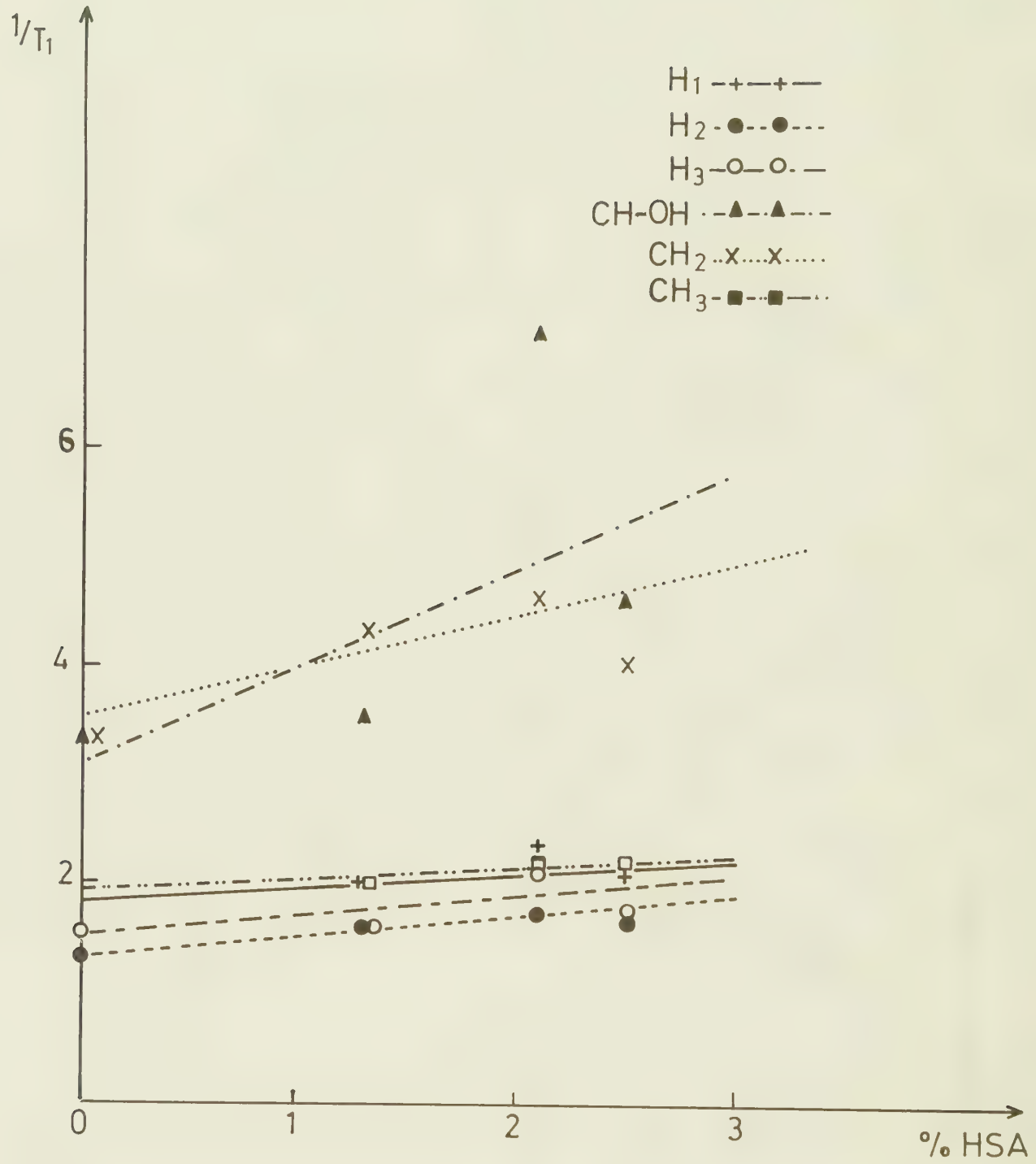


Fig. 11 : Variation de $^{1}/T$ 1 en fonction de la concentration d'albumine pour une solution 0,25 M d'adrénaline.

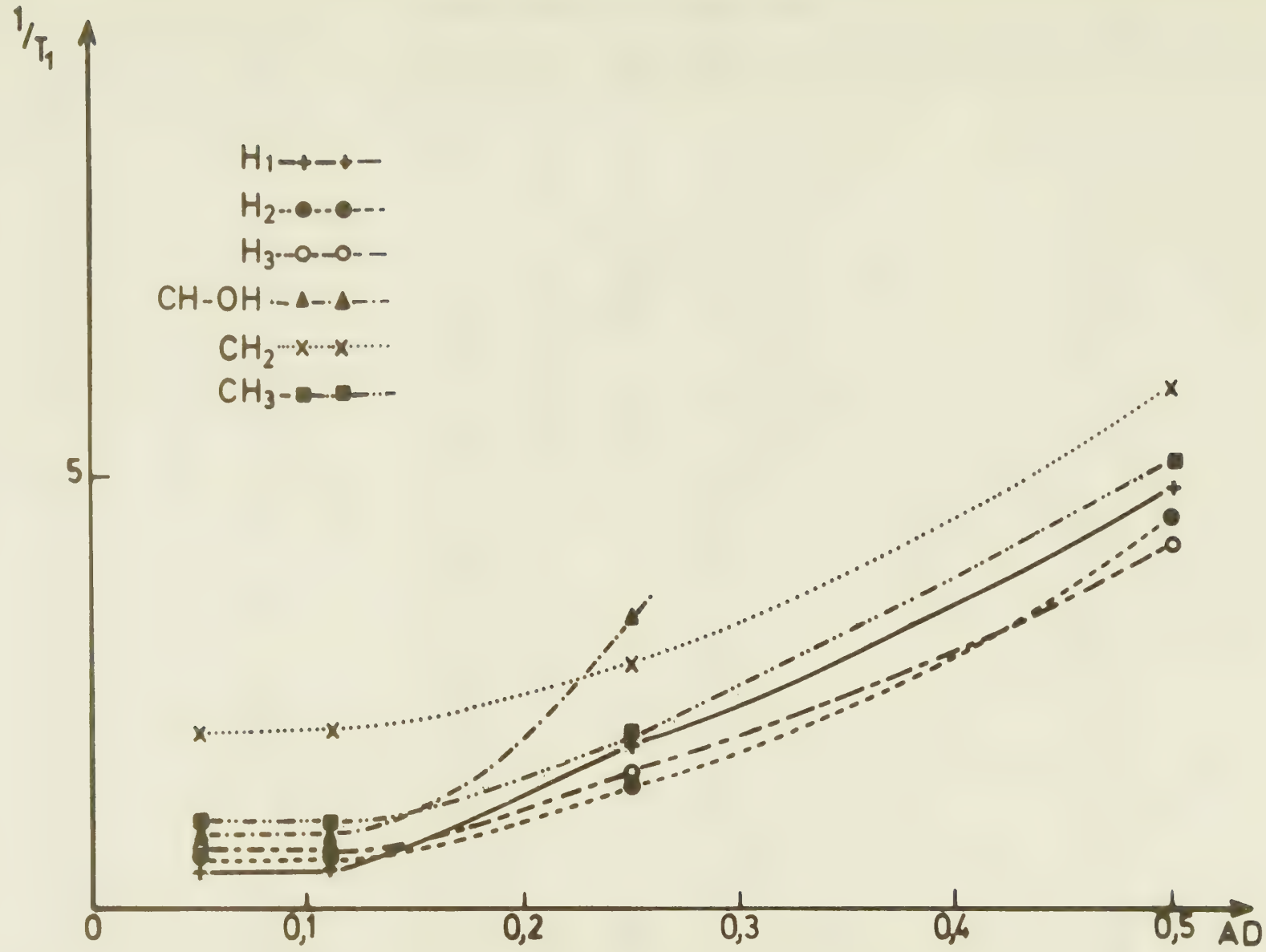


Fig. 12 : Variation de 1/T 1 en fonction de la concentration d'adrénaline pour des solutions ne contenant pas d'albumine.

Tableau 5 : Variation de $1/T_1$ en fonction de la concentration d'adrénaline pour des solutions ne contenant pas de protéine.

AD	1/AD	H_1	H_2	H_3	CH-OH	CH_2	CH_3
0,05 M	20	0,365	0,462	0,693	0,990	1,98	0,990
0,10 M	9	0,355	0,447	0,603	0,815	1,98	0,866
0,25 M	4	1,78	1,31	1,51	3,30	2,77	1,93
0,50 M	2	4,62	4,33	4,08	13,86	5,78	4,95

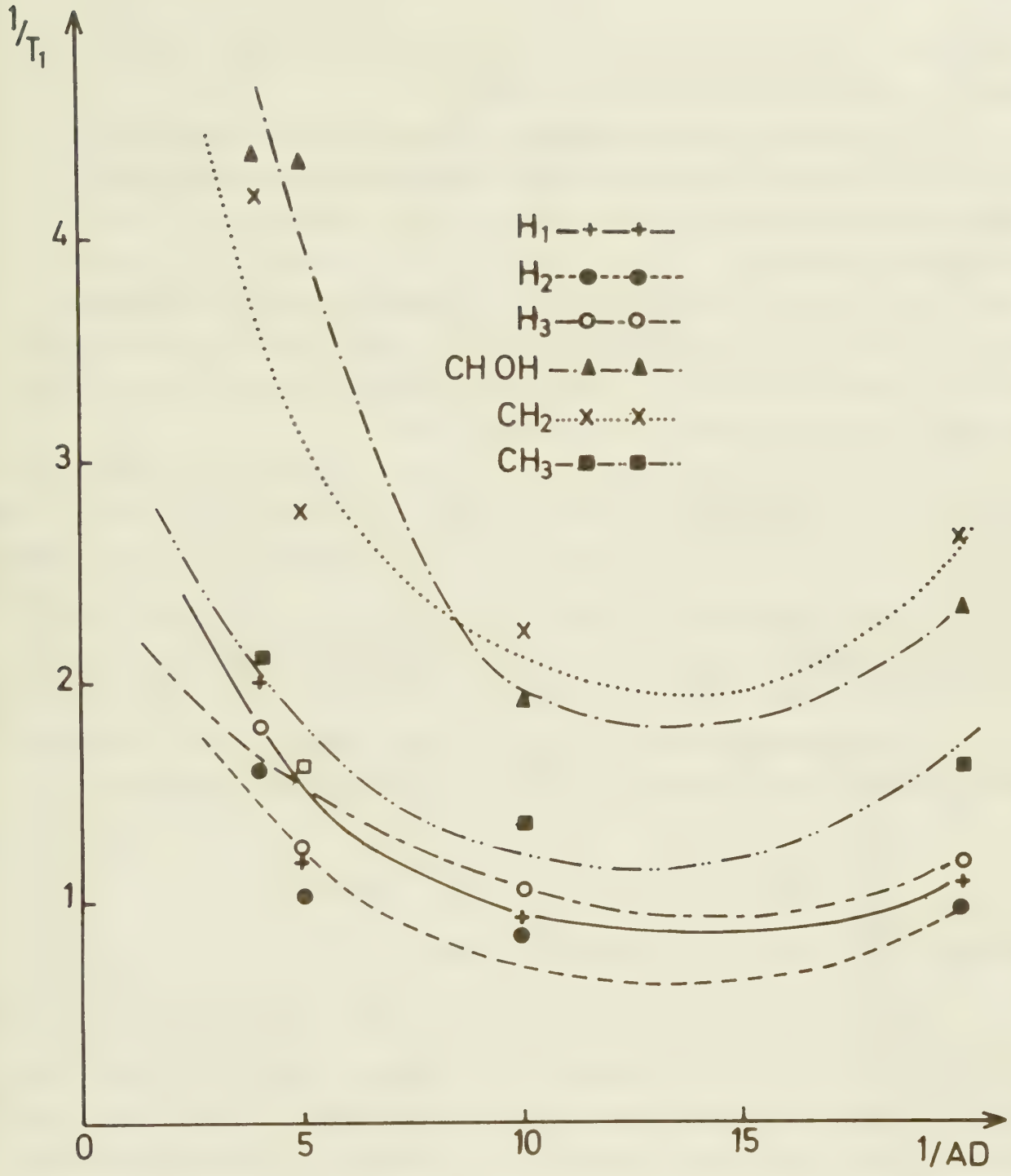


Fig. 13 : Variation de $^{1}/T\ 1$ en fonction de l'inverse de la concentration d'adrénaline (en l/mole) pour des solutions contenant 1,47% d'albumine.

et l'adrénaline (fig. 14). Ceci n'est pas le cas des solutions de concentrations supérieures à 0,1 M d'adrénaline.

La pente des droites donnant $1/T_1$ en fonction de 1/AD est faible pour l'ensemble des protons sauf pour le proton aromatique H_1. En absence d'albumine la variation de T_1 pour ce même proton était l'une des plus faibles.

Une partie des résultats est regroupée dans les tableaux 6 et 7. Au-dessus d'un rapport $[HSA]/[AD]$ égal à 40 (HSA est exprimée en %, AD est exprimé en mole/l) il n'est plus possible d'assimiler la variation de $1/T_1$ à une droite, voir figure 14.

Pour des solutions d'adrénaline de concentrations inférieures à 0,05 M, le rapport $[HSA]/[AD]$ devient très vite supérieur à 40 et la viscosité de la solution devient trop importante pour que la variation de T_1 soit significative.

C'est en réalité le rapport $T_{1\text{libre}}/T_{1\text{liée}}$ des temps de relaxation de la molécule libre et de la molécule totalement liée qui est représentatif de sa capacité de liaison au voisinage d'un proton donné.

La détermination de $1/T_{1\text{liée}}$ se fait à partir de la formule donnant T_1 observé en fonction de α [34] (voir chapitre précédent) :

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{obs} = \alpha \frac{1}{T_{1\ liée}} + (1 - \alpha) \frac{1}{T_{1\ libre}}$$

avec α : fraction molaire d'adrénaline liée.

Cette formule est valable dans le cas d'un échange rapide pour lequel on observe la moyenne des formes libre et liée et pour lequel l'élargissement de raie est différent suivant les pics. Un échange lent se traduirait par la superposition d'une raie large et d'une raie étroite relatives aux deux formes présentes. Un échange intermédiaire dans le cas où il reste une grande quantité de molécules libres en solution ferait apparaître un élargissement identique pour tous les pics [35].

La loi d'action de masse donne la constante K_D de dissociation du complexe en fonction des concentrations initiales AD d'adrénaline et HSA d'albumine :

$$K_D = \frac{AD(1-\alpha)\ (nHSA-\alpha AD)}{\alpha AD}$$

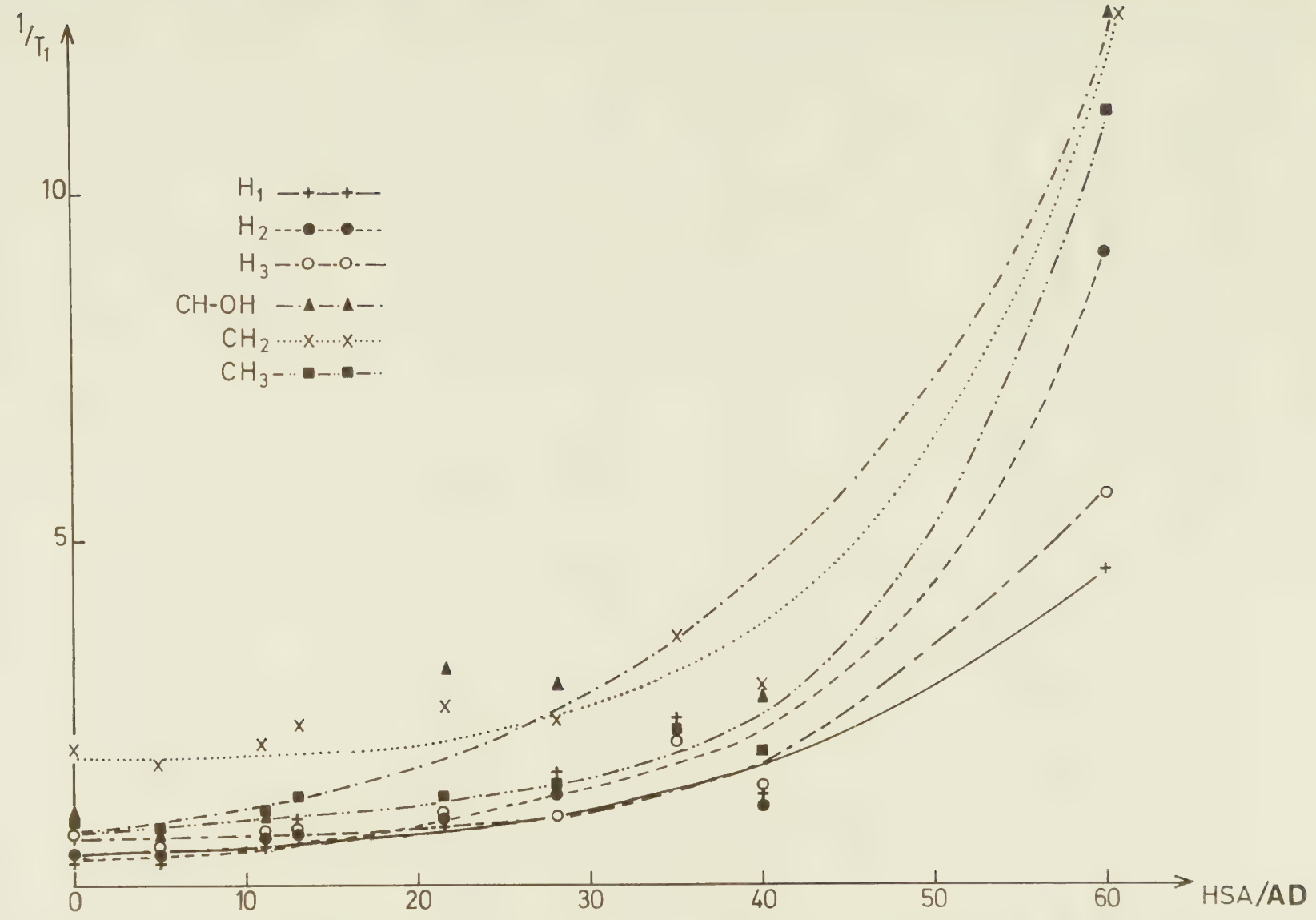


Fig. 14 : Variation de 1/T 1 en fonction du rapport des concentrations d'albumine (en %) et d'adrénaline (en mole/l).

Tableau 6

a - Variation de $1/T_1$ en fonction du pourcentage d'albumine

AD	$\frac{HSA}{AD}$	HSA (%)	H_1	H_2	H_3	CH-OH	CH_2	CH_3
0,05 M	0	0	0,37	0,46	0,69	0,99	1,98	0,99
	13	0,65	0,87	0,77	0,87	-	2,31	1,31
	29	1,45	0,95	0,87	1,02	2,39	2,39	1,39
	40	2,0	1,24	1,14	1,39	2,77	2,89	1,87
	62	3,1	4,55	9,09	5,56	12,50	12,50	11,11
0,10 M	0	0	0,35	0,46	0,67	0,99	1,93	0,96
	0*	0	0,36	0,45	0,60	0,82	1,98	0,87
	5	0,5	0,35	0,44	0,65	0,77	1,73	0,83
	10*	1,0	0,60	0,60	0,69	0,87	1,16	1,16
	11	1,10	0,62	0,69	0,83	1,16	2,04	1,02
	21,5	2,15	0,87	0,89	1,05	3,15	2,31	1,28
	28*	2,80	1,54	1,33	1,47	2,89	3,15	2,31
	35	3,50	2,39	-	2,10	-	3,30	2,31
0,25 M	0	0	1,78	1,31	1,51	3,30	3,30	1,93
	5,2	1,29	1,98	1,58	1,58	3,47	4,33	1,98
	8,5	2,13	2,31	1,73	2,10	6,93	4,62	2,17
	10	2,50	2,10	1,61	1,73	4,62	4,08	2,17

*ces résultats correspondent à une autre série d'expériences que ceux de la série AD 0,1 M non marqués d'un astérix.

Tableau 6 (suite)

b - Equations des droites représentatives de la variation de $1/T_1$ en fonction du pourcentage d'albumine pour chacun des protons de la molécule d'adrénaline.

$$\begin{cases} A = \text{pente de la droite} \\ B = \text{ordonnée à l'origine} \end{cases}$$

AD		H_1	H_2	H_3	CH-OH	CH_2	CH_3
0,05 M	A	0,39	0,31	0,33	0,86	0,40	0,39
	B	0,46	0,49	0,66	0,99	1,98	0,99
0,10 M	A	0,52	0,29	0,38	0,87	0,44	0,43
	B	0,16	0,38	0,48	0,58	1,59	0,74
0,25 M	A	0,17	0,14	0,16	1,0	0,40	0,11
	B	1,79	1,35	1,49	3,11	3,50	1,91

Tableau 7 : Variation de $1/T_1$ en fonction de la concentration d'adrénaline pour des solutions contenant 1,47% d'albumine.

AD	1/AD	H_1	H_2	H_3	CH-OH	CH_2	CH_3
0,05 M	20	1,08	0,96	1,16	2,30	2,64	1,60
0,10 M	10	0,94	0,84	1,06	1,94	2,22	1,35
0,20 M	5	1,17	1,03	1,20	4,33	2,77	1,61
0,25 M	4	2,00	1,60	1,80	4,40	4,20	2,10

dans cette formule n représente le nombre de sites de liaison par molécule de protéine. Après transformation de l'équation précédente on aboutit à la relation :

$$AD = \frac{-K_D}{1-\alpha} + \frac{nHSA}{\alpha}$$

Nos mesures montrent que la variation de T_1 en fonction de la concentration d'albumine pour le proton du groupe CH-OH est plus rapide que celle du proton H_1 mais le rapport $T_{1libre}/T_{1liée}$ est environ 1,5 fois plus élevé pour ce dernier comme en témoigne les résultats du tableau 8. Le calcul a été effectué pour la solution 0,1 M pour une valeur de $1/T_1$ égale à 2 secondes, le pourcentage d'albumine correspondant est calculé à partir des équations du tableau 7. Puisque l'on se trouve en présence d'un excès d'adrénaline (10^{-1} M) par rapport à la quantité d'albumine (inférieure à 10^{-3} M) on peut admettre que le facteur α représentant la fraction de molécule d'adrénaline liée est voisin du rapport $[HSA]/[AD]$.

Dans tous nos calculs la valeur de $1/T_1$ libre est la moyenne de deux résultats expérimentaux.

En portant la concentration AD en fonction de la concentration HSA pour une même valeur de T_1 et pour une valeur de α petite (conditions vérifiées quand l'adrénaline est en excès par rapport à la sérum albumine) on obtient une droite d'ordonnée à l'origine égale à $-K_D$ (Fig. 15).

Les droites tracées pour chacun des protons de la molécule ne concourent pas en un point de l'axe des ordonnées sauf en ce qui concernent les protons H_2 et H_3. Pour tracer ces droites nous avons utilisé les figures 9, 10 et 11 relatives à des solutions 0,05 M, 0,10 M et 0,25 M, or nous avons vu que seule la solution 0,10 M est représentative. Il n'y a donc rien de surprenant à ce que les droites ainsi obtenues ne soient pas concourantes. Nous pouvons simplement déduire de ces résultats que la constante K_D est inférieure à 0,10 1/mole.

De la variation des temps de relaxation T_1 nous pouvons néanmoins conclure que le site d'interaction au niveau de la molécule d'adrénaline se situe principalement au voisinage du proton H_1, il s'agit probablement d'un hydroxyle phénolique. Un autre groupement semble également concerné par la liaison, c'est le OH aliphatique, ceci se traduit par une variation importante des temps de relaxation des protons du groupe CH_2 en α.

Tableau 8 : Calcul du rapport T_1 libre/T_1 lié pour chacun des protons de la molécule d'adrénaline.

	H_1	H_2	H_3	CH-OH	CH_2	CH_3
$1/T_1$ libre	0,36 ±0,01	0,45 ±0,01	0,64 ±0,04	0,91 ±0,09	1,96 ±0,03	0,92 ±0,04
$1/T_1$ observé	2	2	2	2	2	2
% HSA calculé	3,54	5,59	4,00	1,63	0,93	2,93
α^*	5.10^{-3}	8.10^{-3}	6.10^{-3}	2.10^{-3}	10^{-3}	4.10^{-3}
$1/T_1$ lié	364	203	266	609	308	300
$\frac{T_1 \text{ libre}}{T_1 \text{ lié}}$	1000	450	415	670	160	330

*α représente la fraction de la molécule d'adrénaline liée $\left(\alpha \simeq \frac{[HSA]}{[AD]}\right)$

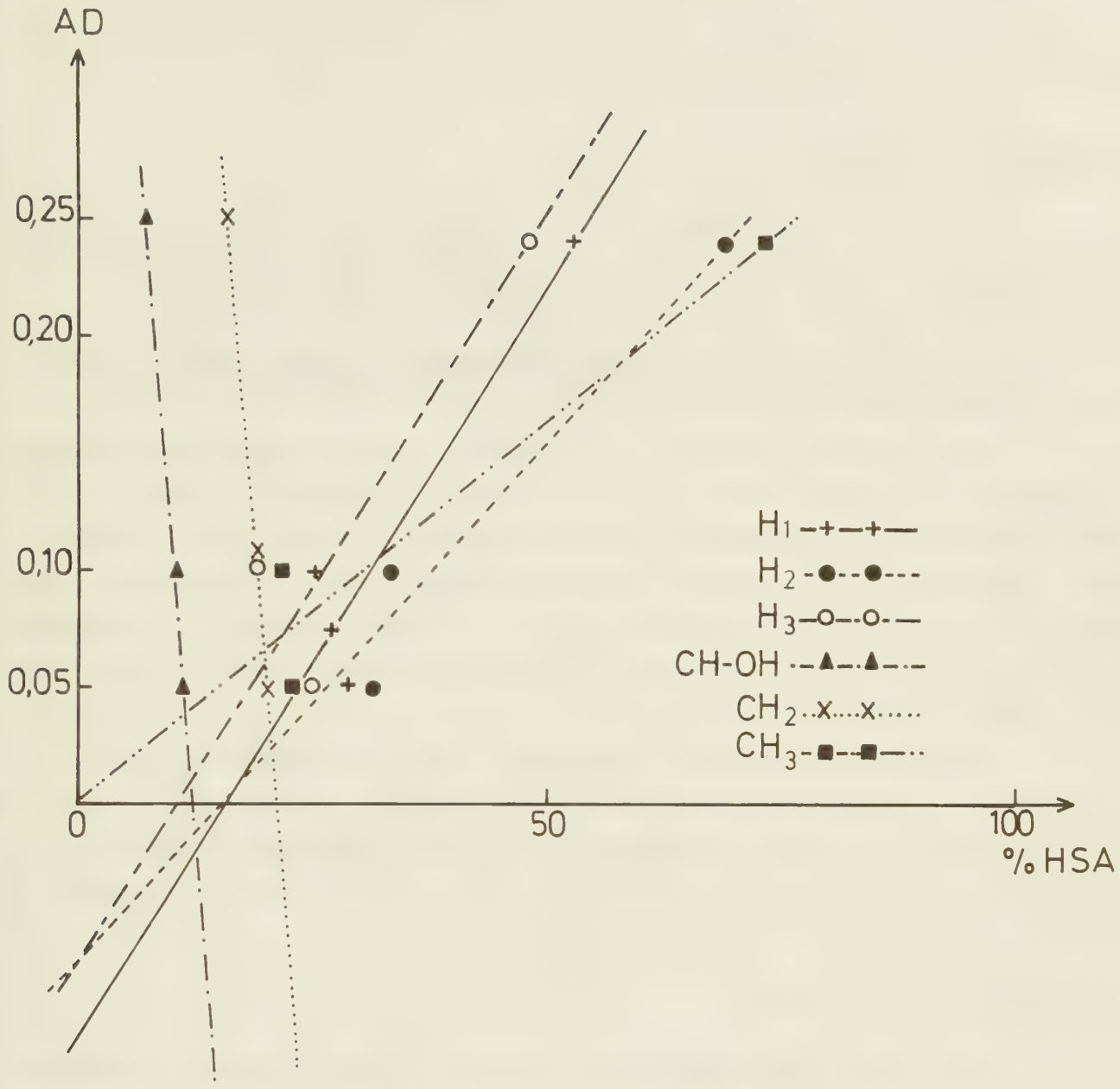


Fig. 15 : Variation de la concentration d'adrénaline (en mole/l) en fonction de la concentration d'albumine pour une valeur de $^1/_{T\,1}$ = 10 sec^{-1}.

3. Etude des temps de relaxation T_2 de la molécule d'adrénaline en présence de sérum albumine humaine.

Contrairement à la mesure de T_1, la mesure de T_2 est difficilement reproductible (voir chapitre précédent), c'est pourquoi nous n'avons utilisé les résultats ainsi obtenus qu'à titre de comparaison avec ceux du paragraphe 2 du chapitre IV.

a) Matériel et méthode.

Les solutions sont les mêmes qui ont déjà été utilisées pour la mesure des temps de relaxation T_1 (voir paragraphe précédent). Nous n'avons étudié ici que des solutions 0,1 et 0,2 M d'adrénaline.

Les spectres ont été enregistrés sur le spectromètre Cameca TSN 250 fonctionnant en balayage continu des fréquences.

Les largeurs des pics à mi-hauteur ont été mesurées suivant le schéma de la figure 16. Afin de vérifier la méthode, un des spectres a également été décomposé en Lorentziennes, calculées au moyen d'un ordinateur PDP 12-Digital par simulations successives dont le résultat final est présenté figure 17. Le tableau 9 compare les largeurs de pics ainsi calculées aux largeurs mesurées directement en utilisant notre approximation.

Nous préciserons dès maintenant que la largeur du pic relatif au proton H_1 est particulièrement peu précise surtout en ce qui concerne les spectres tracés en présence de sérum albumine (voir fig. 7). D'autre part en raison de la proximité du pic HDO le triplet relatif à CH-OH est parfois difficilement mesurable.

b) Résultat et discussion.

Une série de 10 spectres relatifs à une solution d'adrénaline 0,1 M se trouve figure 18. La première moitié montre l'élargissement des pics en présence de quantités croissantes de sérum albumine humaine, la seconde moitié montre l'élargissement des mêmes pics en présence de quantités croissantes de gamma globuline humaine. La figure 19 compare les spectres en présence de 0-1-2% d'albumine.

La largeur d'un pic à mi-hauteur étant inversement proportionnel au temps de relaxation T_2, nous avons représenté figures 19 et 20 la variation de $1/T_2$ en fonction du pourcentage d'albumine ou de

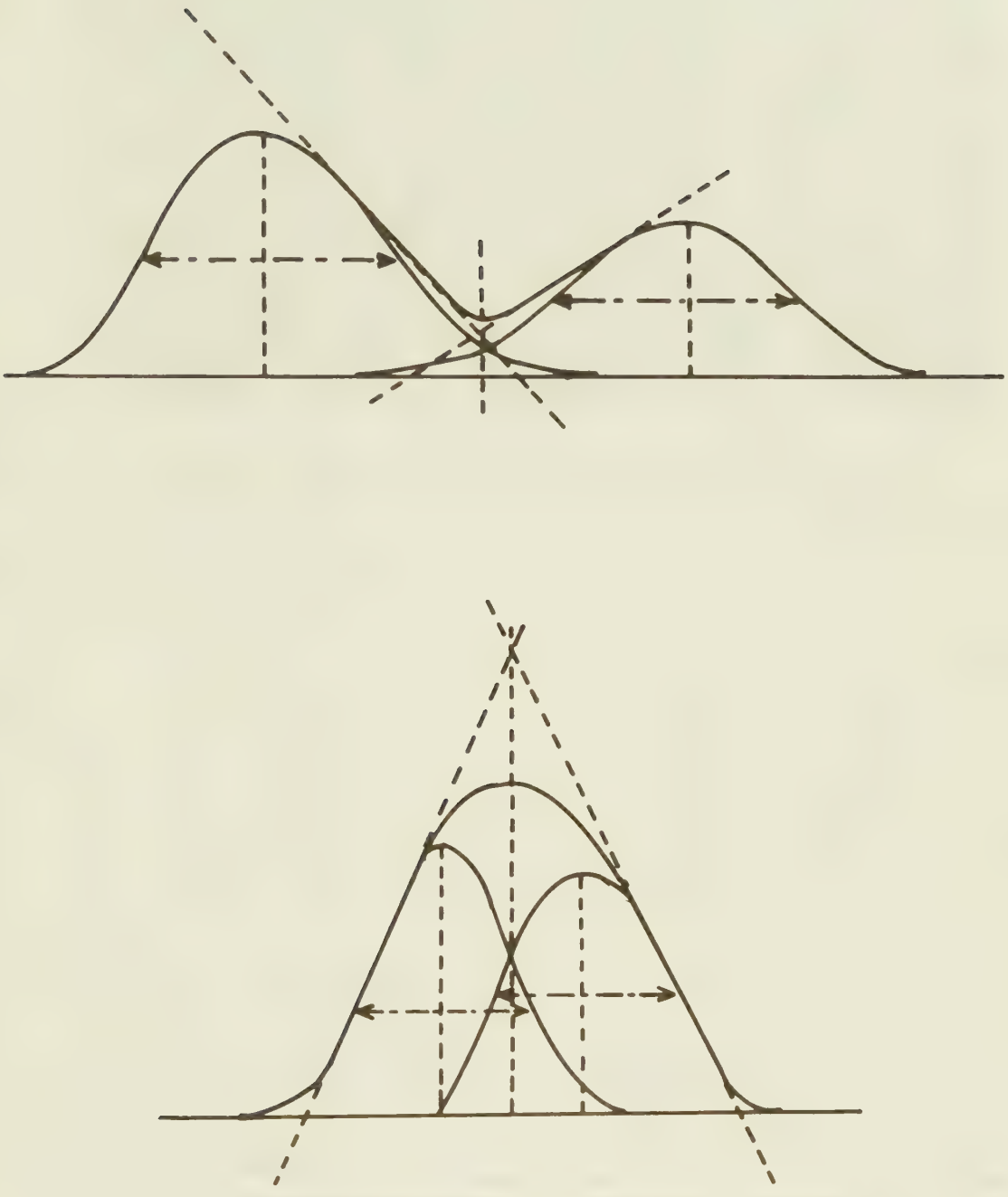


Fig. 16 : Mesure des largeurs de raies à mi-hauteur.

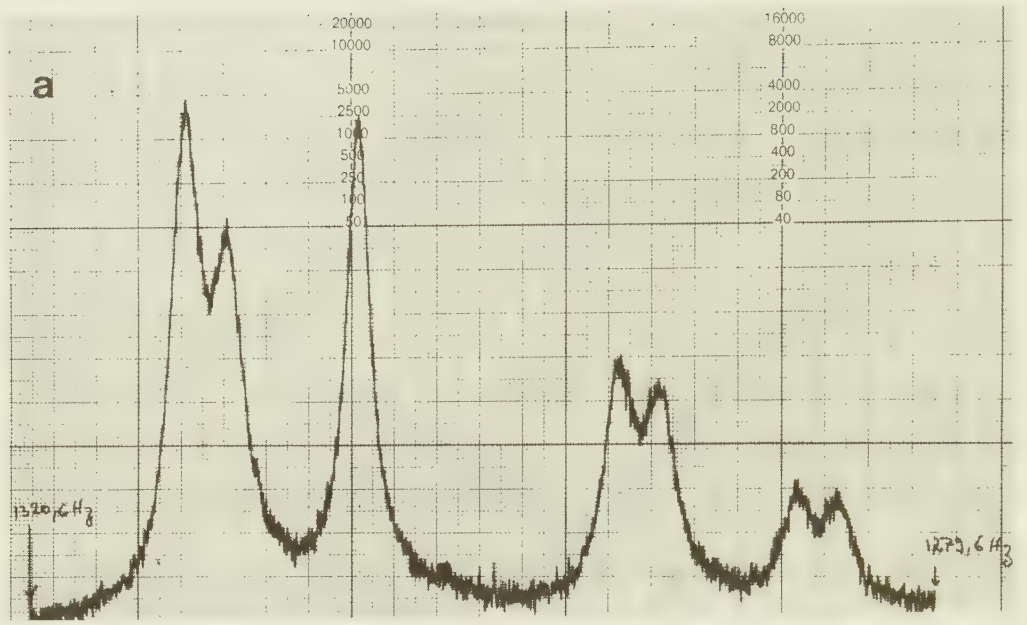


Fig. 17 a : mesure des largeurs de raies par simulation de spectre : spectre expérimental.

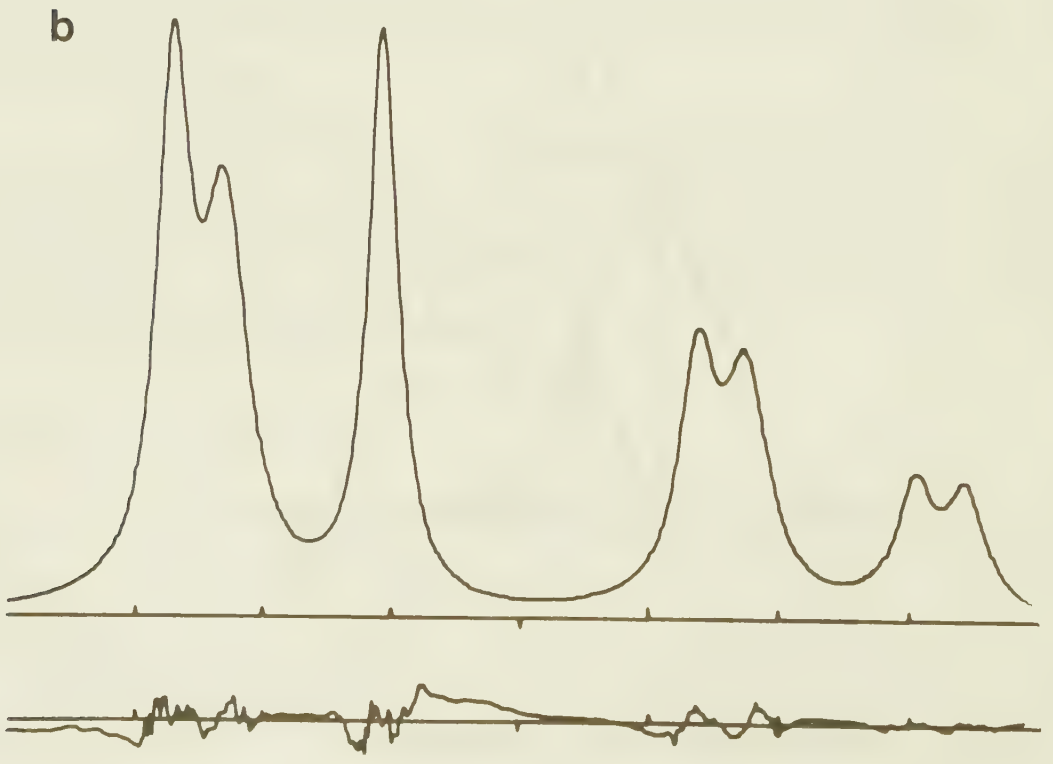


Fig. 17 b : mesure des largeurs de raies par simulation de spectre :
- en haut : le spectre résultant
- en bas : la différence avec le spectre expérimental

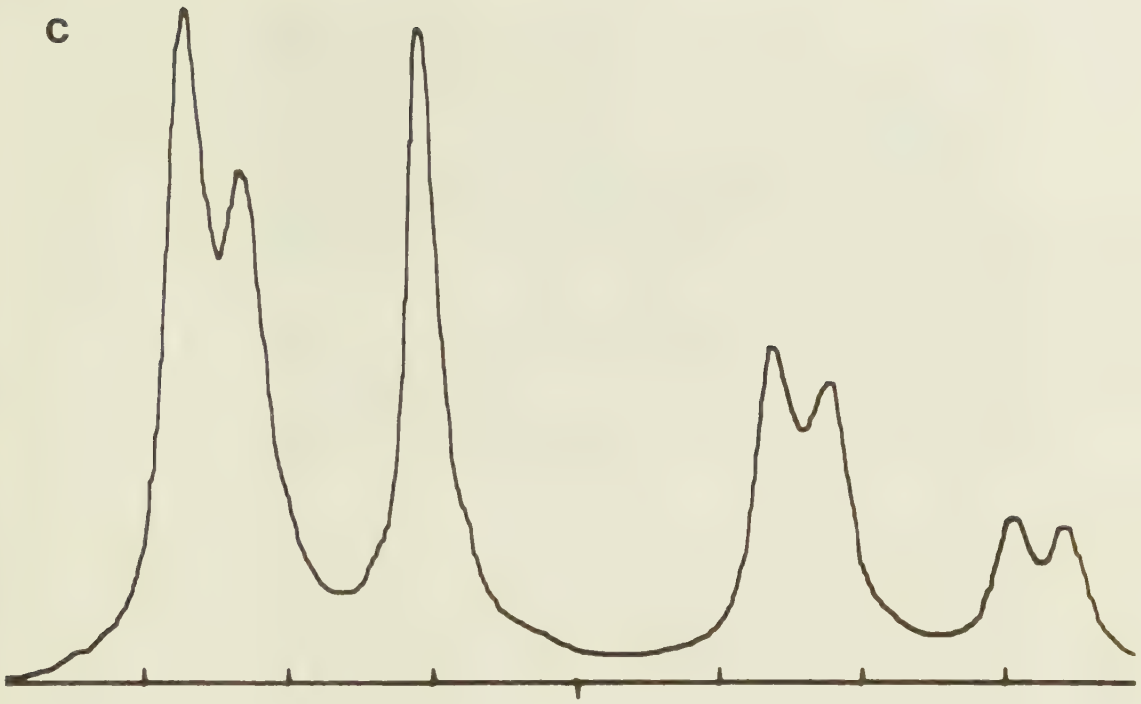


Fig. 17 c : mesure des largeurs de raies par simulation de spectre : spectre expérimental numérisé.

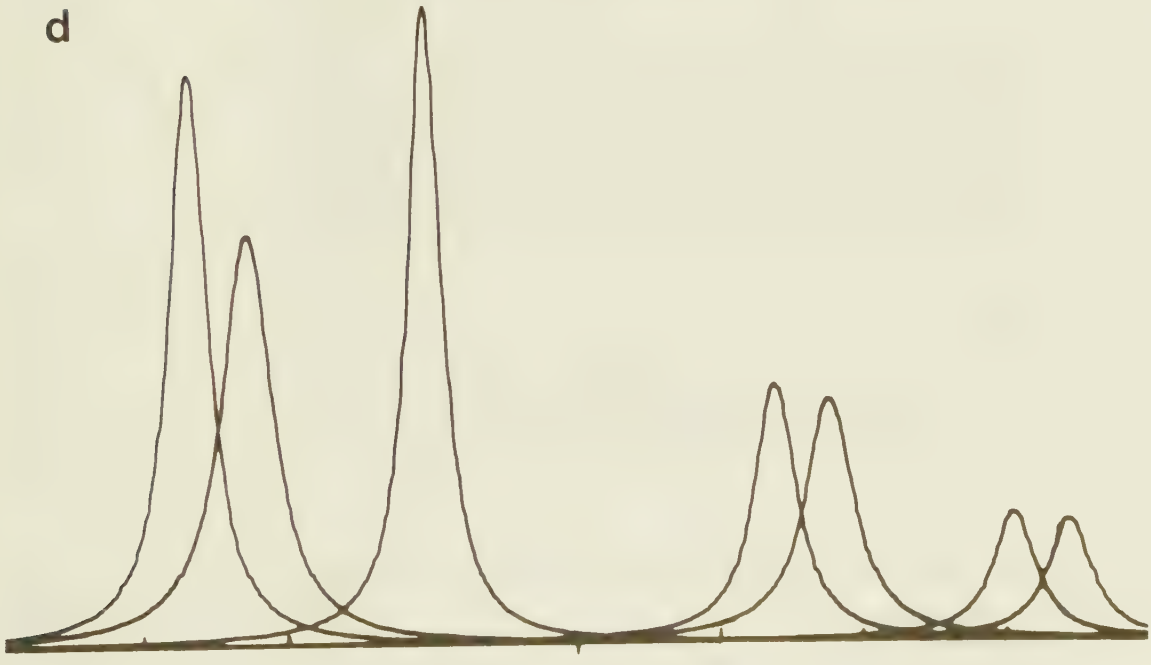


Fig. 17 d : mesure des largeurs de raies par simulation de spectre : décomposition en lorentziennes du spectre numérisé.

Tableau 9 : Comparaison des largeurs de raies mesurées et calculées par simulation (fig. 17)

numéro du pic	proton	mesure	calcul
1	H_2	0,75	0,80
2	H_1	0,90	1,05
3	H_2	0,70	0,70
4	H_3	0,85	0,90
5	H_3	0,81	1,05
6	H_3	1,10	0,90
7	H_3	0,80	0,90

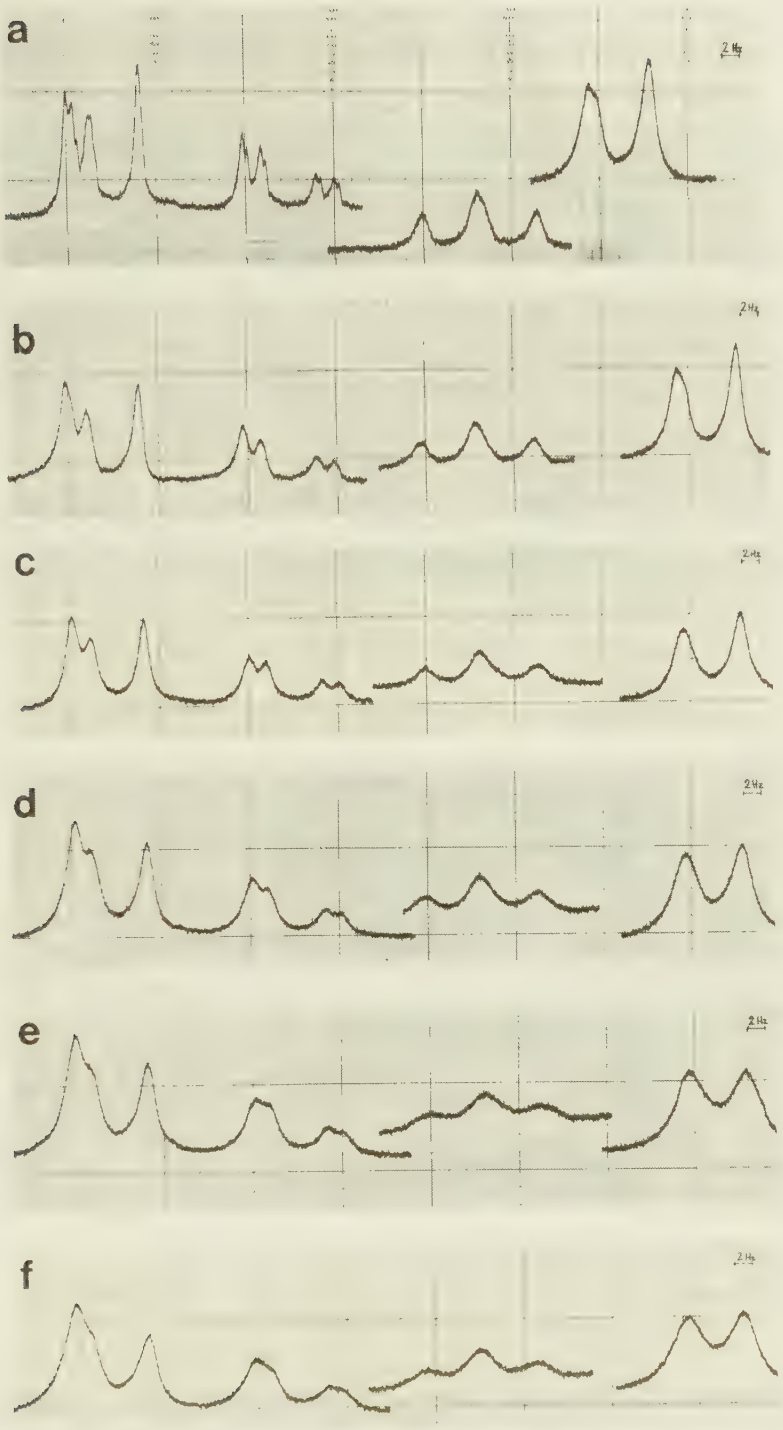


Fig. 18 : Elargissements de raies observés en présence de quantités croissantes d'albumine.

Balayage sur 120 Hz - solution 0,11 M d'adrénaline dans D_2O à p^{H*}

a. 0% d'albumine - b. 0,95% d'albumine - c. 2,13% d'albumine

d. 3,02% d'albumine - e. 3,68% d'albumine - f. 4,88% d'albumine.

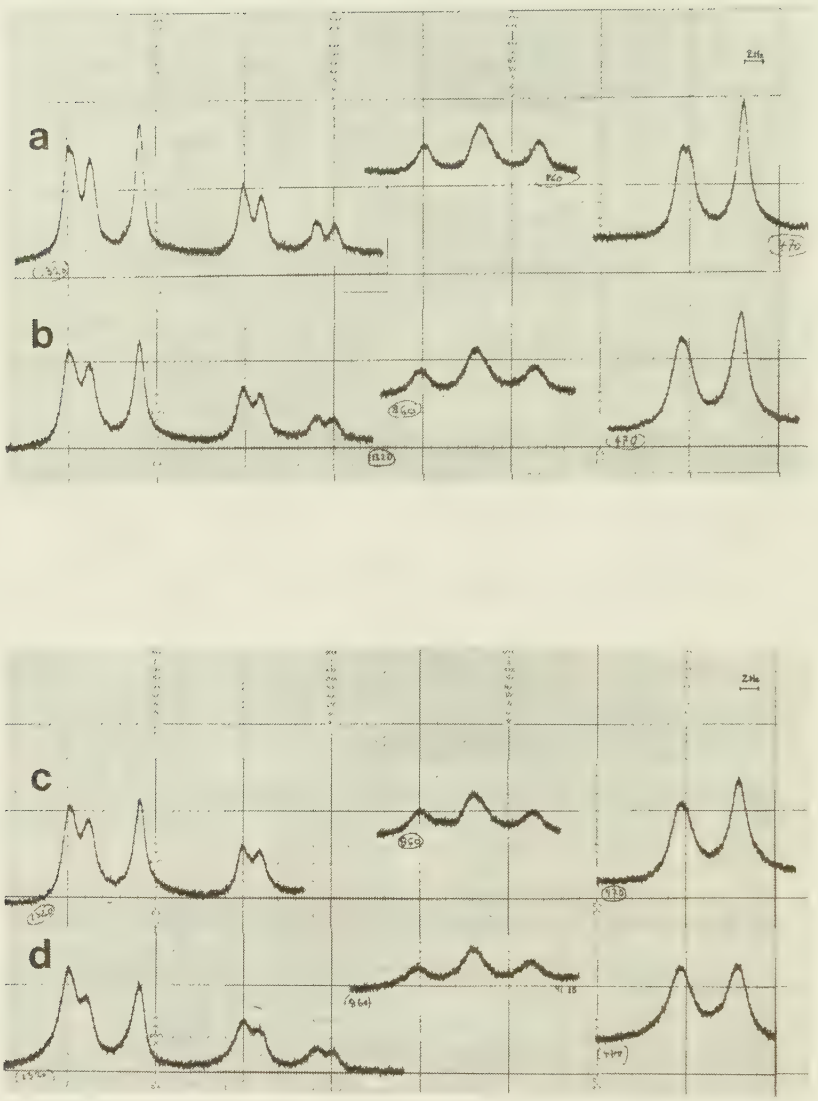


Fig. 19 : Elargissements de raies observés en présence de quantités croissantes de gamma globuline.

Balayage sur 120 Hz - solution 0,11 M d'adrénaline dans D_2O à $pH^{\neq}$ = 5,24.

a. 0,56% de gamma globuline - b. 1,48% de gamma globuline -

d. 2,39% de gamma globuline - d. 3,46% de gamma globuline.

globuline pour des solutions d'adrénaline 0,1 et 0,2 M. Les protons les plus influencés par l'approche de la protéine sont le proton aromatique H_2, le proton du groupe alcoyle et les protons en α de ce groupe. Bien que la largeur de toutes les raies du spectre varient d'une expérience à l'autre les variations relatives des différents protons restent inchangés. Pour les protons aromatiques H_1 et H_3 ainsi que pour les protons méthyliques, la pente des droites représentatives de la variation de $1/T_2$ demeure faible comparée à celle des autres droites. Cependant elle peut se trouver multipliée par un facteur 2 ou 3 d'une expérience à l'autre (figures 22 et 23 et figures 20 et 21).

Pour une même solution d'adrénaline, $1/T_2$ varie moins rapidement en présence de gamma globuline qu'en présence d'albumine. Si nous tenons compte des résultats du chapitre II, nous pouvons en conclure que c'est en raison de l'absence d'affinité de l'adrénaline pour la gamma globuline.

Nous avons donc envisagé de comparer la différence de variation de $1/T_2$ de chacun des protons pour l'albumine et pour la gamma globuline. D'après les résultats du tableau 10 relatifs aux figures 20 et 21, la pente de la droite relative au proton aromatique H_1 se trouve multipliée par 3, alors qu'elle n'est que 1,5 fois plus grande dans le cas des protons des groupes éthyle et méthyle et du proton aromatique H_2 ; et elle reste pratiquement inchangée en ce qui concerne les deux protons restants. Ces résultats rejoignent ceux qui ont été obtenus pour les temps de relaxation T_1, c'était en effet le proton aromatique H_1, qui était le plus affecté par l'approche de la sérum albumine. Les résultats obtenus par mesure du temps de relaxation T_2 nous ont montré que le proton aromatique H_2 se distinguait par un comportement particulier.

Les résultats sur T_2 seuls tendraient donc à montrer que les protons H_1 et H_2 se trouvent au voisinage du site d'interaction. Ce résultat est identique à ce qui a été obtenu au moyen des temps de relaxation T_1 , mais les mesures de T_1 permettent de mieux distinguer entre H_1 et H_2 alors qu'en T_2 la relaxation du seul proton H_2 est facilement mesurable.

En étudiant la variation de T_2 en absence de protéine nous avons constaté que dans certains cas T_2 augmente quand la concentration d'adrénaline diminue, ce qui est caractéristique d'un phénomène non spécifique. Nous avons retrouvé cette anomalie pour tous les protons sauf H_1.

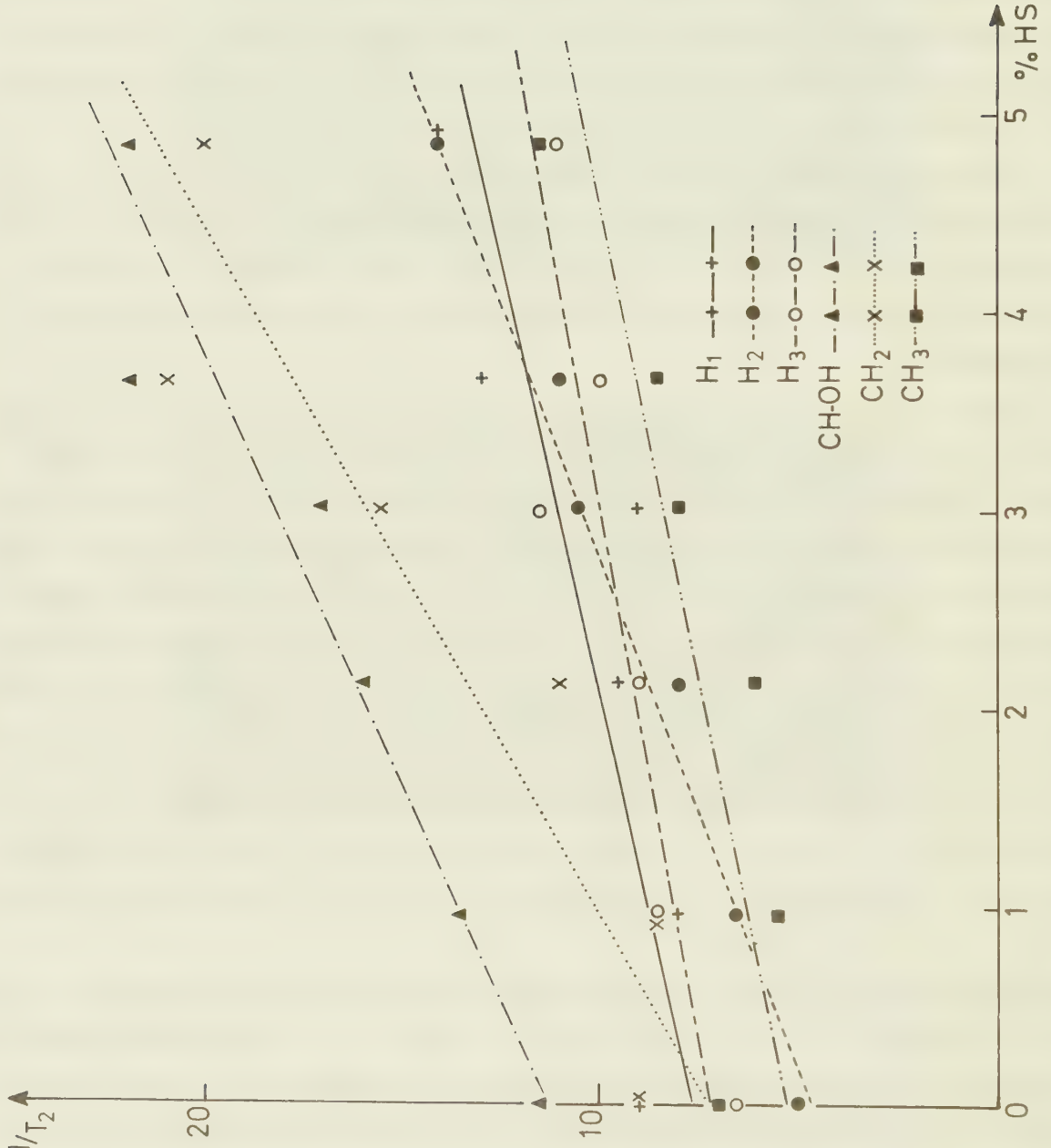


Fig. 20 a - Variation de 1/ T 2 en fonction du pourcentage d'albumine pour une solution d'adrénaline C,1 M.

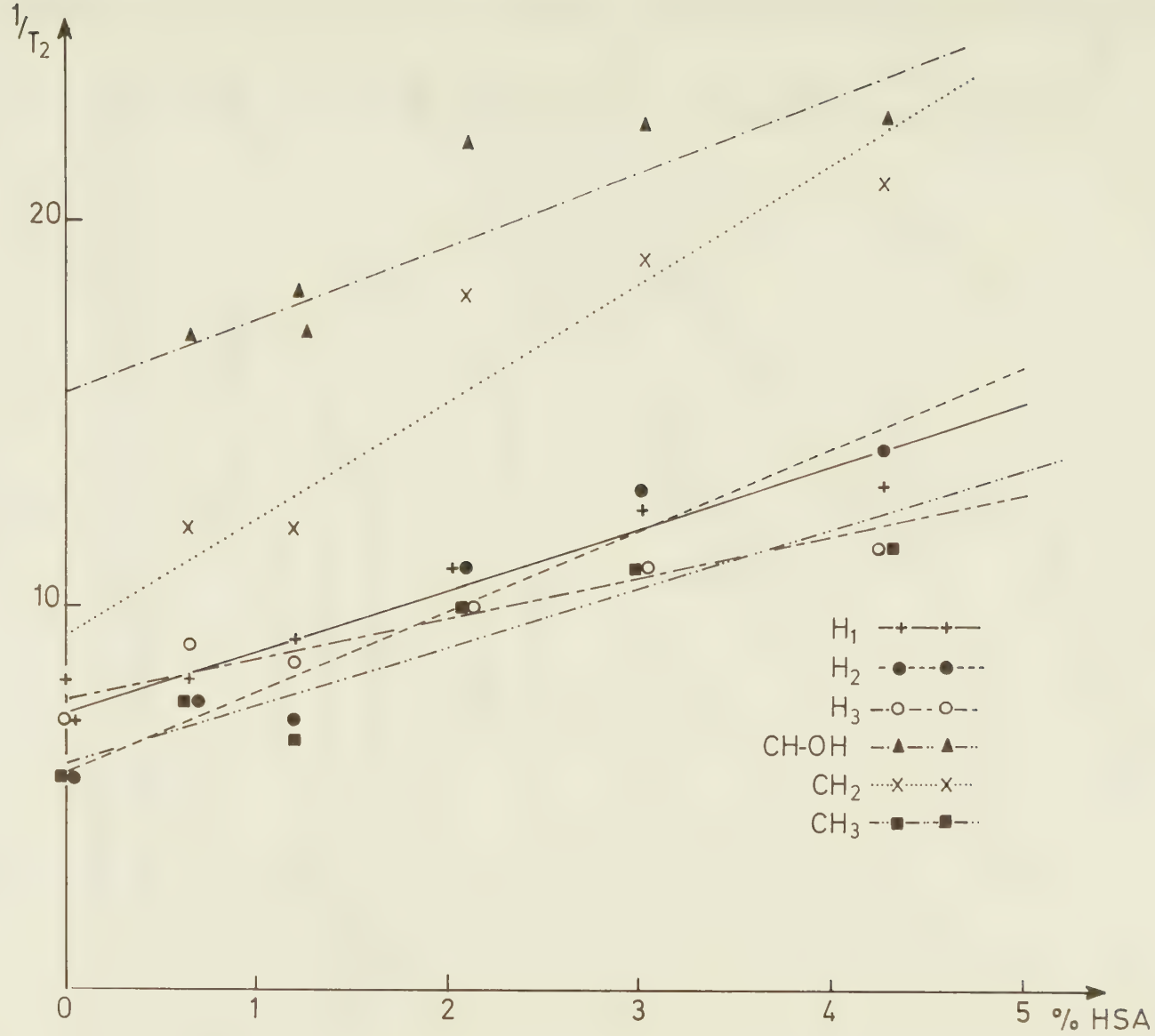


Fig. 20 b : variation de 1/T 2 en fonction du pourcentage d'albumine pour une solution d'adrénaline 0,2 M.

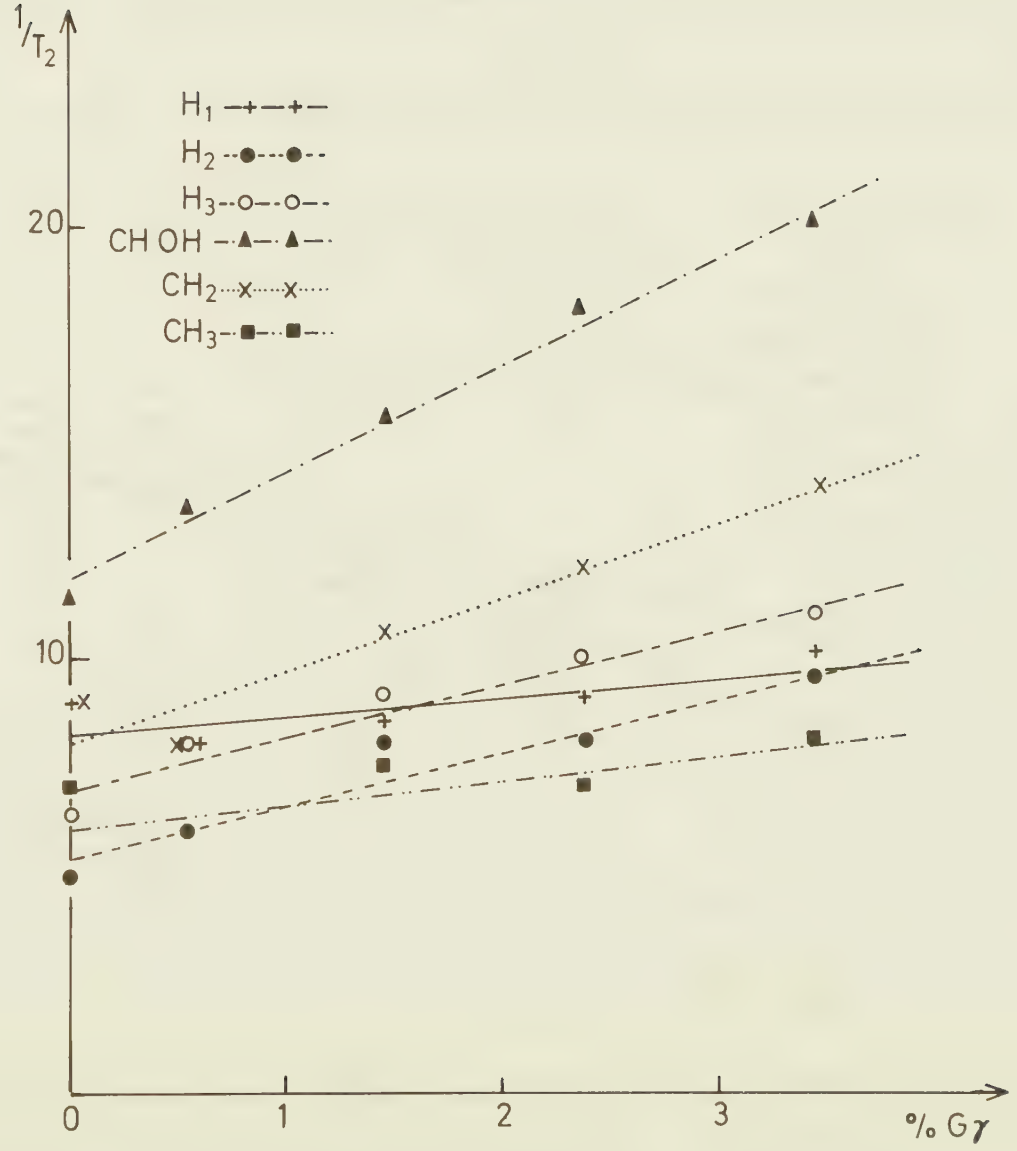


Fig. 21 : variation de 1/T 2 en fonction du pourcentage de gamma globuline pour une solution 0,1 M d'adrénaline.

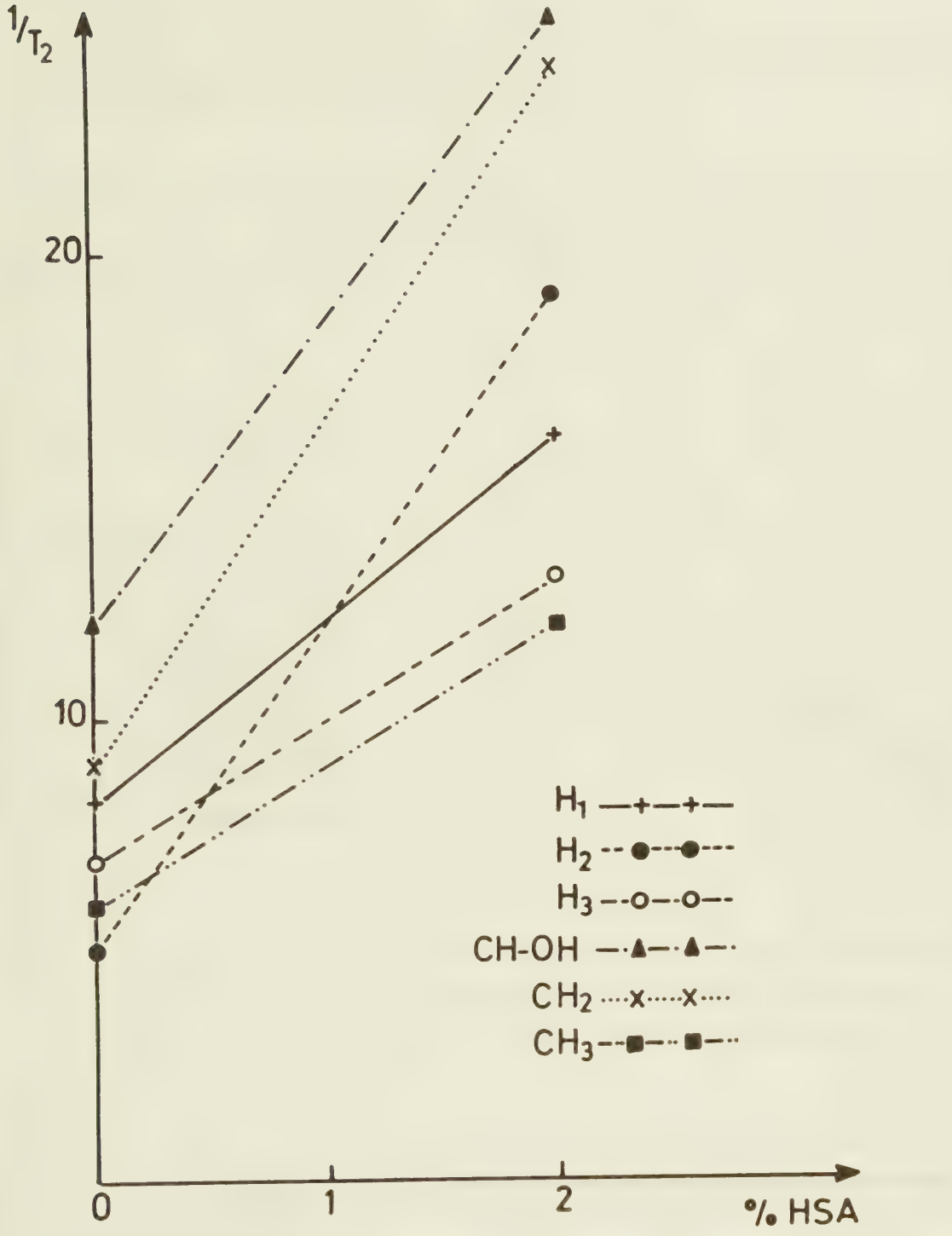


Fig. 22 : Variation de $^{1}/T_2$ en fonction de la concentration d'albumine pour une solution 0,22 M d'adrénaline.

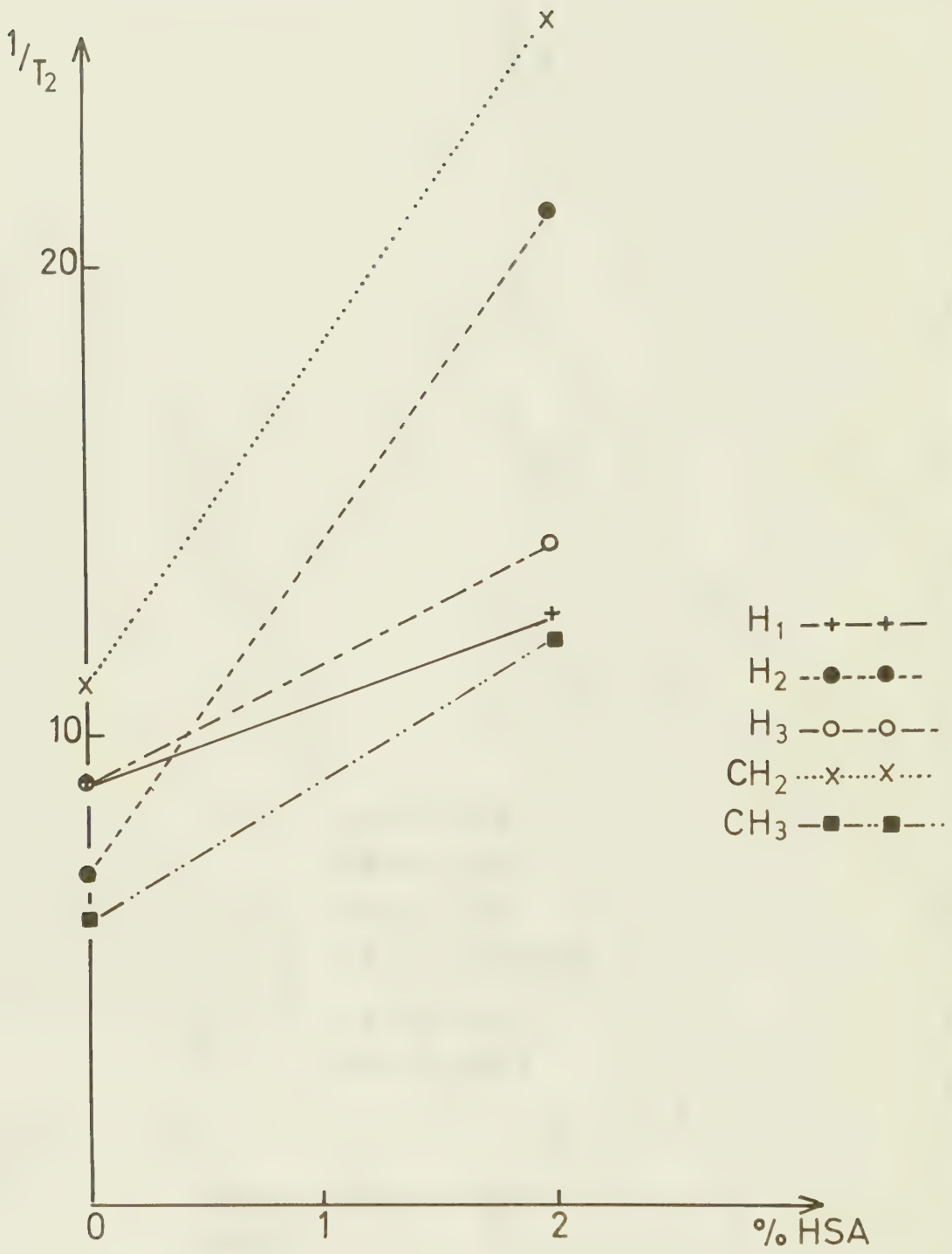


Fig. 23 : Variation de $^{1}/T_2$ en fonction de la concentration d'albumine pour une solution 0,13 M d'adrénaline.

Tableau 10

a - Equations des droites représentatives de la variation de $1/T_2$ en fonction du pourcentage d'albumine pour chacun des protons de la molécule d'adrénaline.

		pente de la droite	ordonnée à l'origine
AD 0,1 M	H_1	1,15	7,61
	H_2	1,82	4,71
	H_3	0,90	7,23
	CH-OH	2,32	11,33
	CH_2	2,83	7,26
	CH_3	0,99	5,33
AD 0,2 M	H_1	1,51	7,25
	H_2	2,13	5,69
	H_3	1,00	7,63
	CH-OH	2,03	15,53
	CH_2	3,06	9,28
	CH_3	1,48	5,90

b - Equations des droites représentatives de la variation de $1/T_2$ en fonction du pourcentage de gamma globuline pour chacun des protons de la molécule d'adrénaline.

		pente de la droite	ordonnée à l'origine
AD 0,1 M	H_1	0,38	8,30
	H_2	1,24	5,34
	H_3	1,24	6,95
	CH-OH	2,44	11,86
	CH_2	1,64	8,11
	CH_3	0,50	6,11

D'autre part si nous choisissons de représenter non plus $1/T_2$ mais $(1/T_2)_{obs} - (1/T_2)_{libre}$ nous observons en l'absence de protéine, que cette quantité croît en fonction de la concentration d'adrénaline, par contre en présence de 2% d'albumine elle augmente ou diminue suivant les cas. Pour H_1, cette différence est multipliée par 2 quand on passe d'une solution 0,22 M à 0,13 M d'adrénaline (figs 22 et 23), elle demeure pratiquement inchangée en ce qui concerne le proton H_2 (variation de une unité pour une variation de concentration de 0,1 M).

Les résultats obtenus en temps de relaxation T_2 semblent confirmer les comportements particuliers en présence d'albumine du proton H_1 et du proton alcoyle ; ils soulignent d'autre part une influence non négligeable au niveau du proton H_2.

4. Conclusion.

D'après l'ensemble de ces résultats de RMN du proton nous pouvons dire que le site d'interaction est localisé au voisinage des protons H_2 et H_1. Nous pouvons postuler que la liaison se fait par l'intermédiaire des groupements phénoliques de la molécule. L'approche de la protéine ayant lieu du côté le plus fermé c'est-à-dire du côté de H_1 ; ainsi ceci lui permet de se trouver proche du groupement OH de la chaîne qui joue sans nul doute un rôle important dans l'interaction, même si celui-ci n'est pas essentiel.

V. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES.

1. Données spectroscopiques en RMN du ^{13}C.

Quelques expériences de RMN du carbone 13 [36] sur l'adrénaline non enrichie (soit 1% de ^{13}C) ont permis une première approximation des divers paramètres spectroscopiques de la molécule.

a) Matériel et méthodes.

L'adrénaline, (provenance : Fluka) est mise en solution 0,1 M - 0,2 M ou 0,5 M dans D_2O et DCl à pH acide voisin de 1.

Les spectres sont enregistrés sur un appareil CFT20 Varian équipé de la transformée de Fourier. Le nombre des accumulations varie de 5000 à 40 000 suivant la concentration de la solution et le type d'expérience. L'angle de basculement des spins est voisin de 30°, il correspond à une durée d'impulsion de 7 µsec.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le découplage des protons afin de déterminer la valeur des déplacements chimiques du carbone (figures 24 et 25). Puis, en supprimant ce découplage durant le temps d'accumulation consécutif à l'impulsion et en le rétablissant pendant le temps de recouvrement avant l'impulsion suivante (fig. 26) nous avons obtenu les couplages entre atomes de carbone et d'hydrogène. L'angle de basculement utilisé alors était d'environ 60°, correspondant à une durée d'impulsion de 15 µsec.

La calculateur associé au spectromètre ne possède que 16 K de mémoire et le spectre tracé sur 4000 Hz n'est défini que par 8192 points au maximum. Pour obtenir une meilleure résolution de la région spectrale correspondant aux carbones aromatiques nous avons

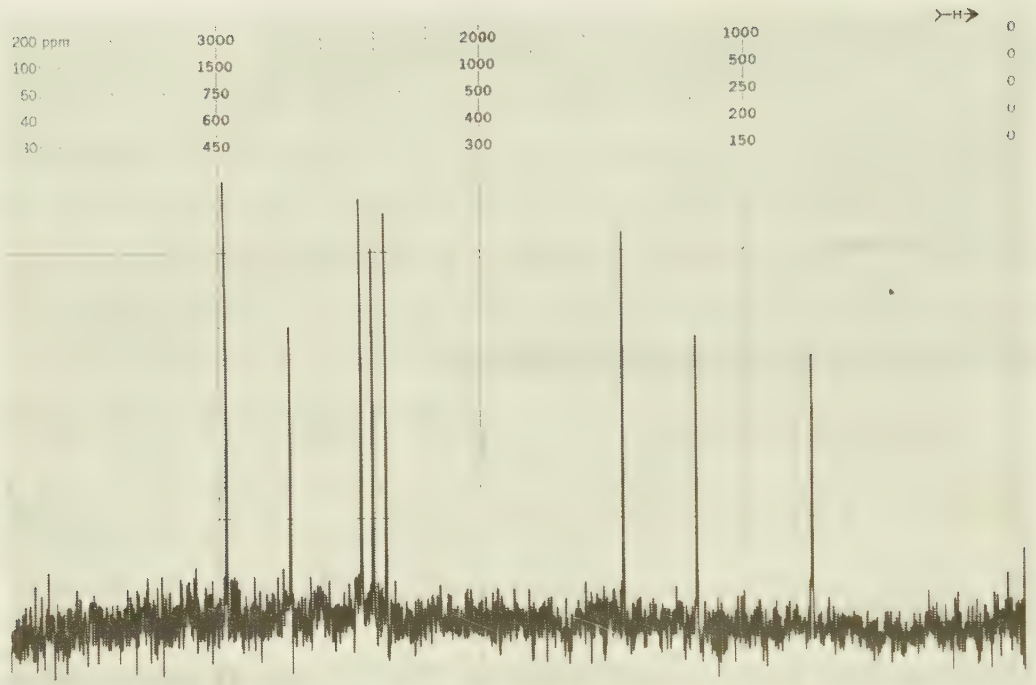
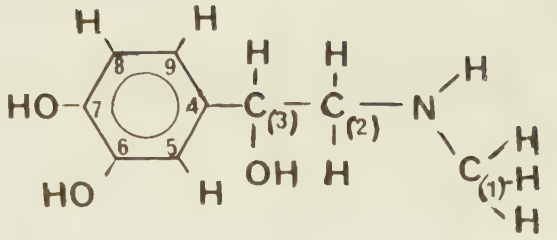


Fig. 24 : Spectres carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,1 M dans D_2O à $pH^{\neq} = 1,3$.

Utilisation du découplage proton en continu

nombre d'accumulations : 10 628
temps d'acquisition : 0,5 sec
durée de l'impulsion : 7 µ sec
temps d'attente : 3,5 sec.



	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9
δ	784,8	1227,8	1506,3	2784,8	2506,3	3025,3	3025,3	2468,4	2411,4
J_{C-H}	145,6	139,2	151,9	–	164,6	–	–	158,2	158,2

Fig. 25 : Déplacements chimiques et constantes de couplage des carbones de l'adrénaline (δ en ppm et J en Hz).

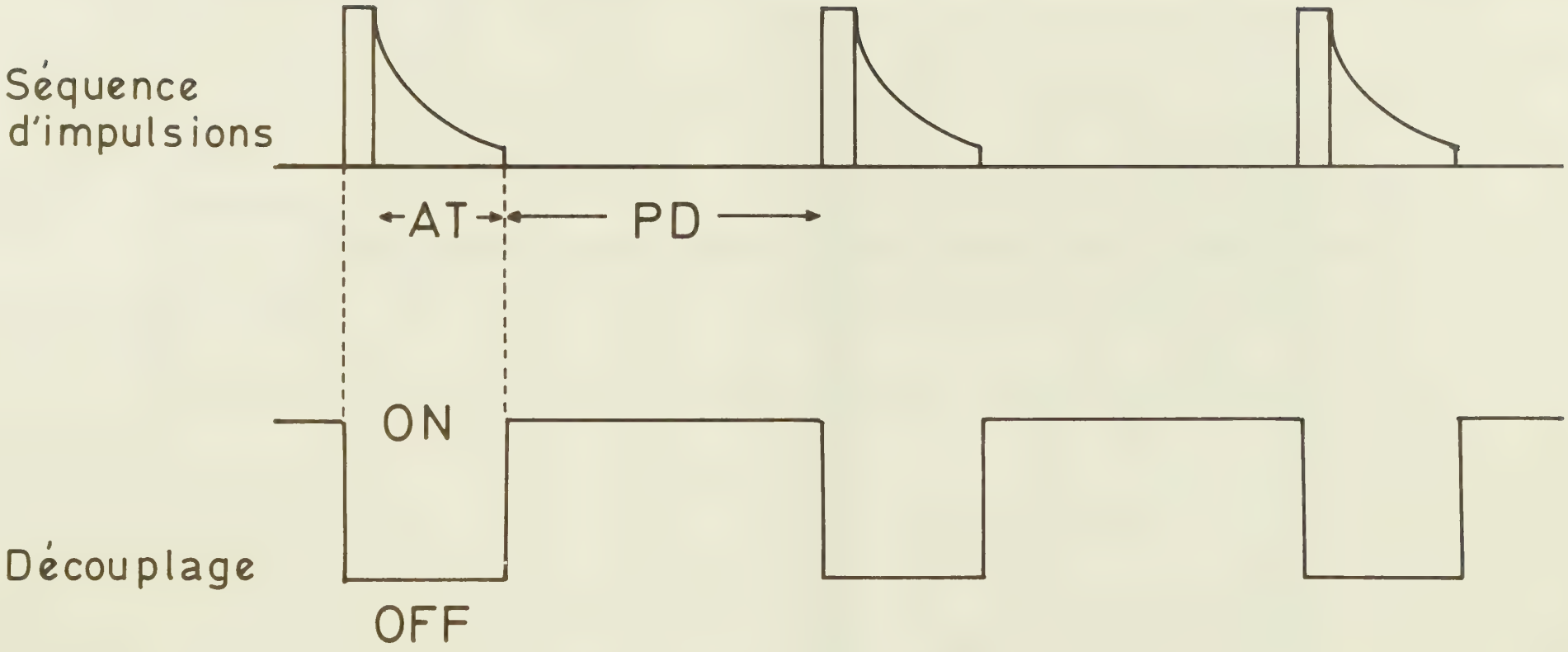


Fig. 26 : Séquence des impulsions utilisées en RMN du ^{13}C et découplage

AT : temps d'aquisition

PD : temps d'attente avant l'impulsion suivante.

déplacé la fréquence porteuse à haut champ et réduit la largeur spectrale à 500 Hz de manière à obtenir les pics des carbones C_4 à C_9 avec une définition maximale.

b) Résultats et discussion.

Les différents spectres sont réunis figures 27 et 28. Les carbones aromatiques résonnent à bas champ, les carbones aliphatiques à haut champ. D'après STOTHERS [37] l'ordre croissant des déplacements chimiques pour les carbones C_4 à C_9 est le suivant : δ_9, δ_8, δ_5, δ_4, δ_6 et δ_7.

L'utilisation d'un découplage "offset" des protons permet d'observer les couplages C-H à travers une liaison avec une valeur inférieure ($\sim$ 30 Hz) à leur vraie valeur ($\sim$ 100 Hz) et ainsi d'identifier les différents carbones : un carbone non lié à un atome d'hydrogène donne un singulet, les groupes CH, CH_2 et CH_3 donnent respectivement des doublets, triplets et quadruplets. Les carbones aromatiques donnent des doublets s'ils sont liés à un atome d'hydrogène et des singulets dans le cas contraire (carbone quaternaire ou lié à un groupe hydroxyle).

Les valeurs des déplacements chimiques et des couplages C-H pour chacun des carbones ont été obtenues par simulation sur ordinateur (voir chapitre IV), les résultats sont récapitulés sur la figure 29.

Il est remarquable que le couplage entre un atome de carbone aromatique et un atome d'hydrogène à travers trois liaisons est plus grand que le couplage à travers deux liaisons. En RMN du proton c'est le couplage entre protons en positions ortho (à travers 3 liaisons) qui est plus important que le couplage entre protons en positions meta (à travers 4 liaisons). Les couplages C-H à longue distance à travers quatre liaisons sont plus faibles, comme dans le cas des couplages entre protons en position para (à travers 5 liaisons).

2. Temps de relaxation T_1 en RMN du ^{13}C.

Les temps de relaxation ont été calculés pour deux solutions d'adrénaline 1M dans D_2O en présence de O et 1% d'HSA ; le pH a été ajusté à 5,2 au moyen de solutions concentrées de NaOD et DCl.

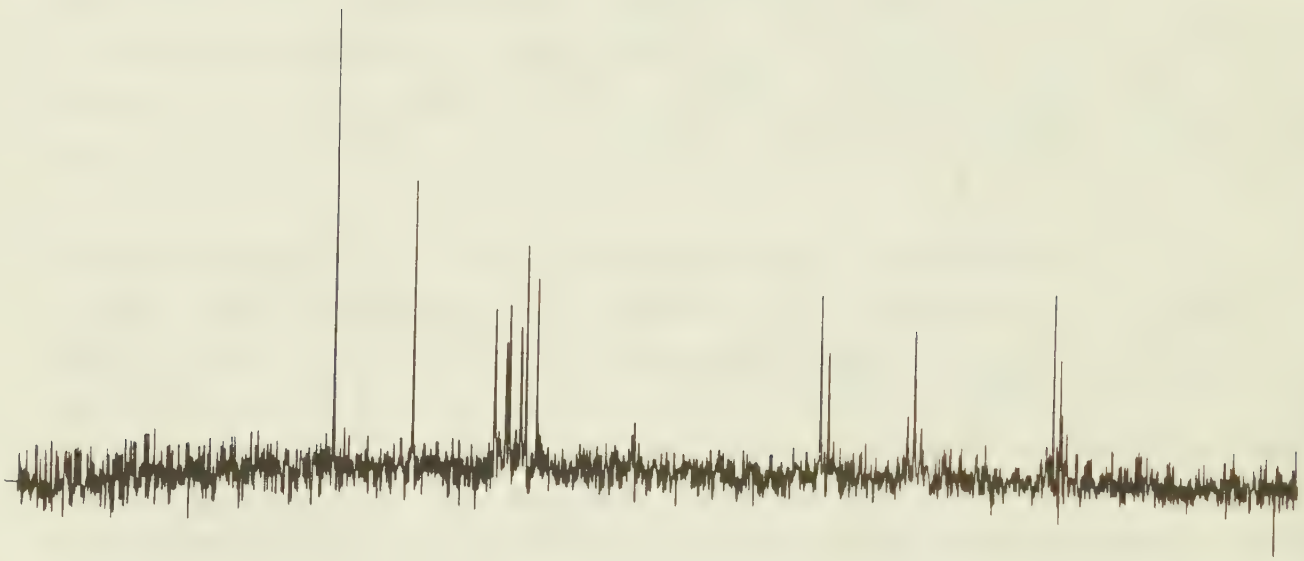


Fig. 27 : Spectre carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,2 M dans D_2O à $p^{H*} = 1,3$

utilisation du découplage partiel
nombre d'accumulations : 19.280
temps d'acquisition : 0,5 sec.
durée de l'impulsion : 7 µsec.
temps d'attente : 3,0 sec.

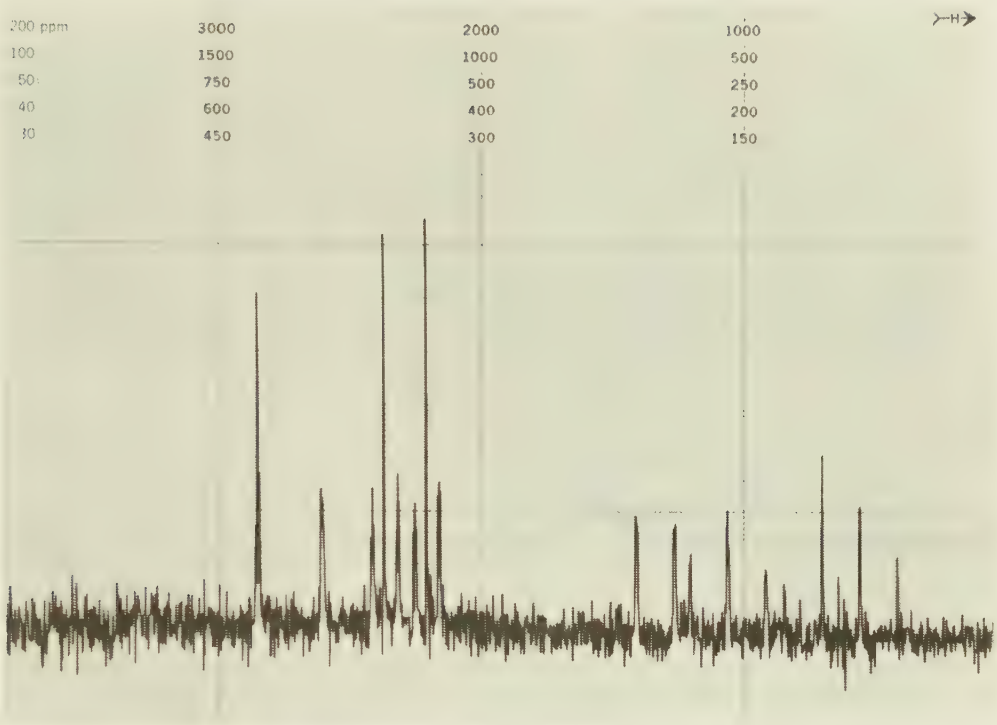


Fig. 28 a : Spectre carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,2 M dans D_2O à p^{H^*} = 1,3
observation des couplages C-H réels
nombre d'accumulations : 23.596
temps d'acquisition : 0,5 sec
durée de l'impulsion : 10 µsec
temps d'attente : 3,0 sec.
largeur spectrale : 4000 Hz

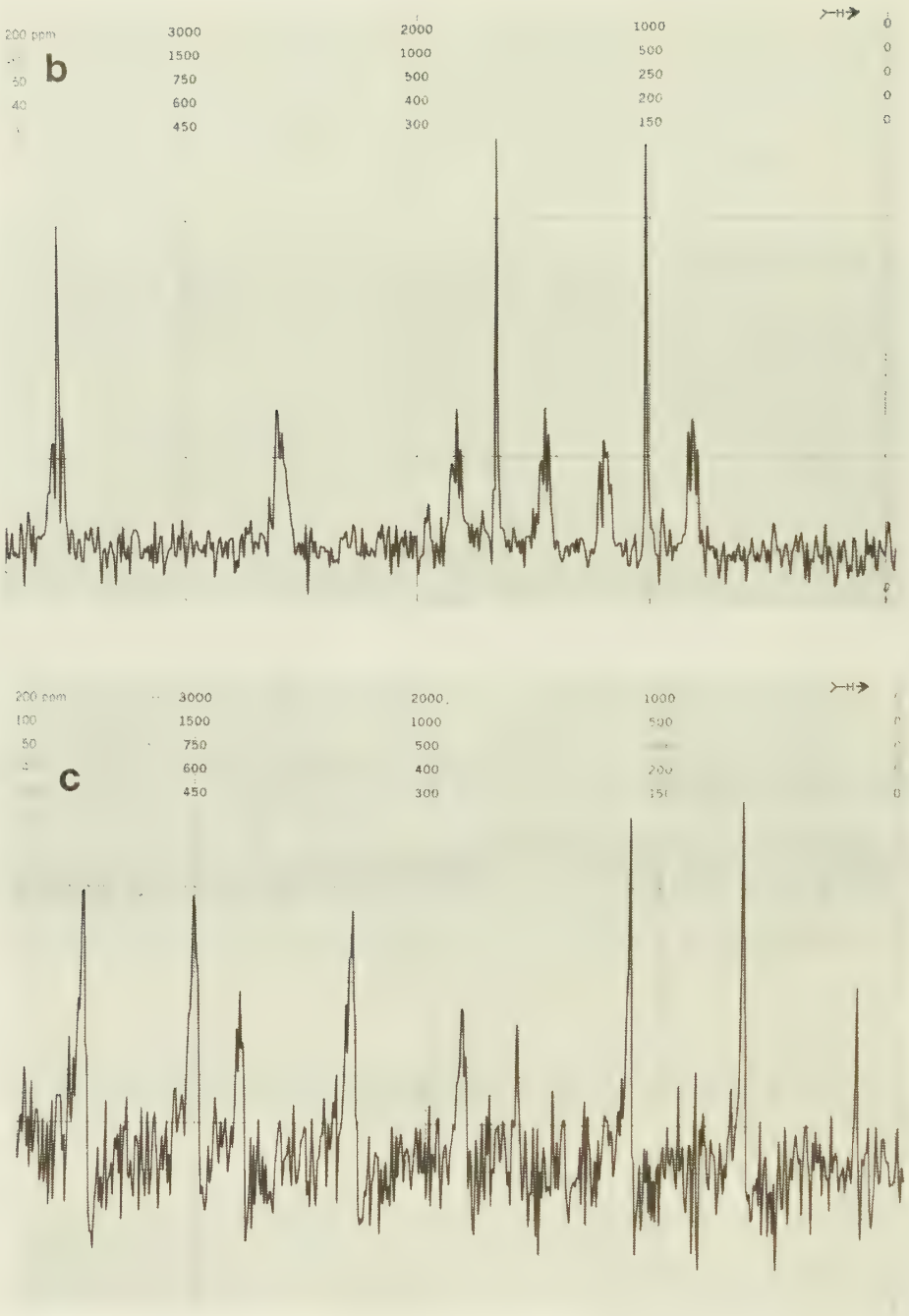


Fig. 28 b et c : Spectres carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,2 M dans D_2O à $p^{H^*} = 1,3$

largeur spectrale : 1000 Hz

Agrandissements du spectre précédent fig. 28 a.

b : région à hauts champs

c : région à bas champs.

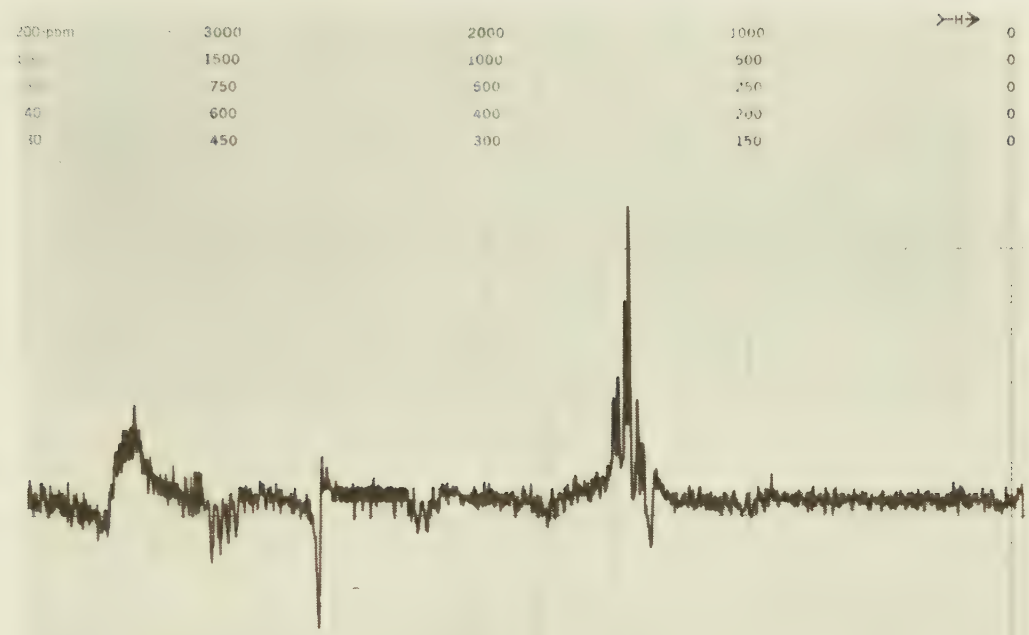


Fig. 28 d : Spectre carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,5 M dans D_2O à $pH^{\#} = 1,3$

largeur spectrale : 500 Hz
utilisation du décalage de la fréquence porteuse
observation des carbones C_6, C_7 et C_4.

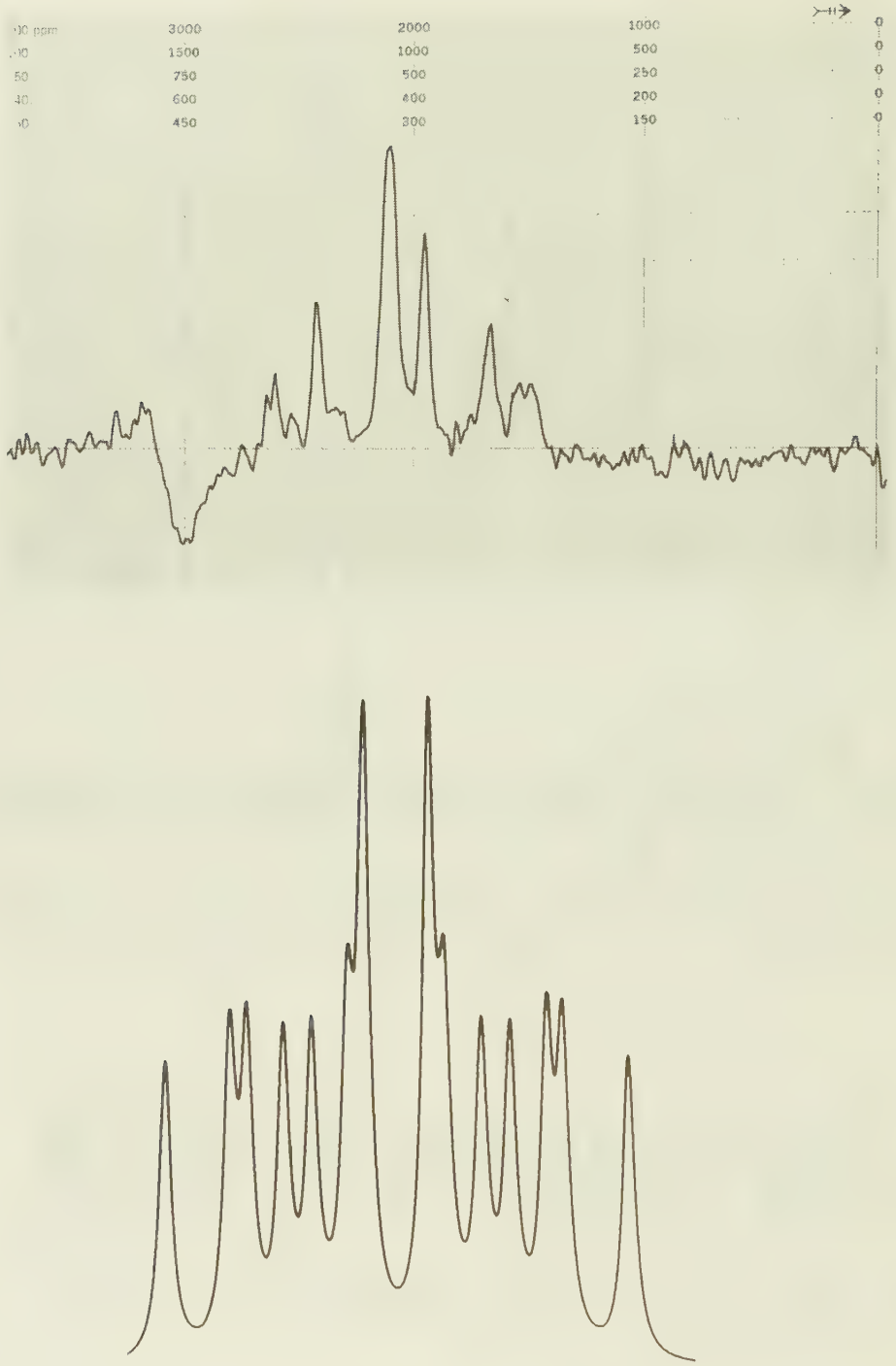


Fig. 29 a : Spectre carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,5 M : durée de l'impulsion = 15 µ sec - temps d'acquisition = 3 sec. - temps d'attente = 5 sec. largeur spectrale = 500 Hz correspondant à C6 et C7 simulation obtenue avec J = 5,5 Hz, J = 1,8 Hz, J4 = 1 Hz.

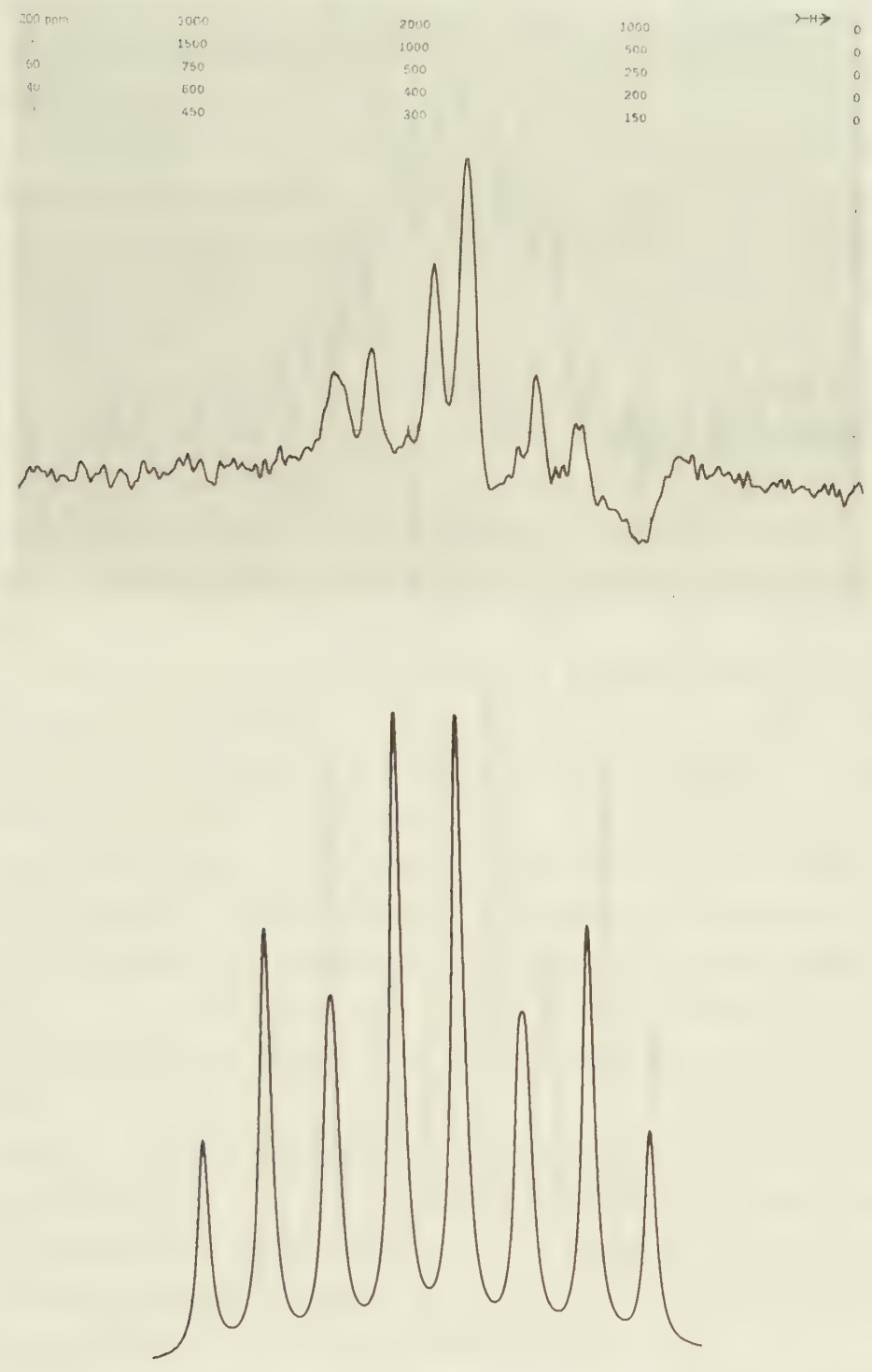
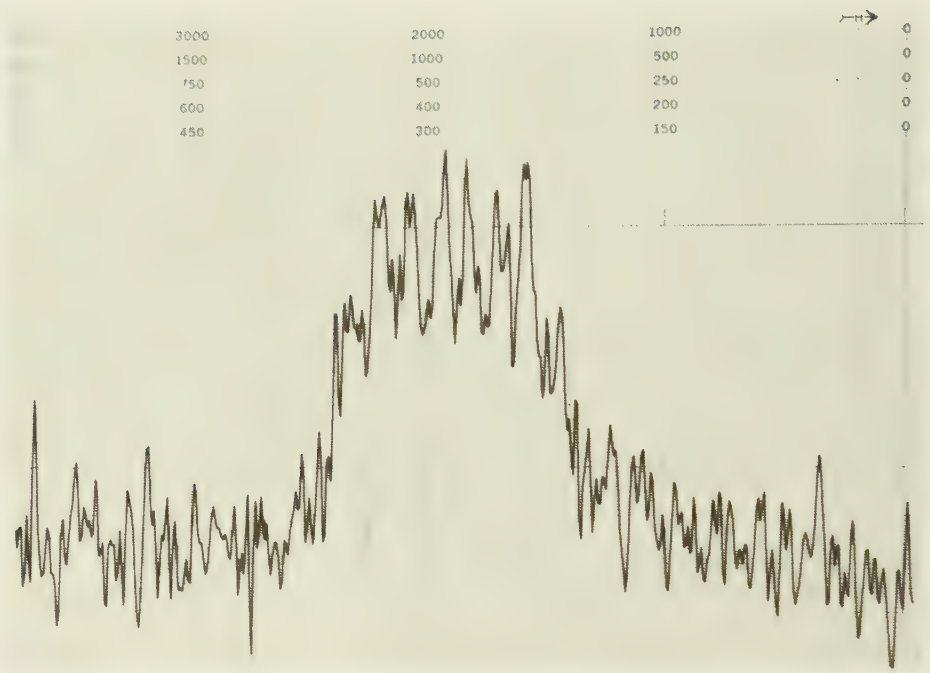


Fig. 29 b : idem Fig. 29 a avec balayage dans l'autre sens
Simulation obtenue avec J2 = 5,5 Hz, Jz = 1,8 Hz, J4 = 2Hz.



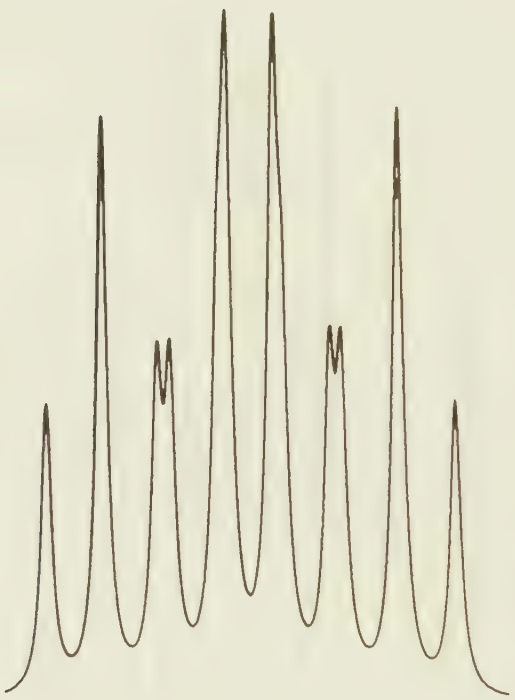


Fig. 29 c : Spectre carbone 13 de l'adrénaline en solution 0,5 : durée de l'impulsion = 15 µsec - temps d'aquisition = 3 sec, temps d'attente : 20 sec. largeur spectrale = 500 Hz correspondant à C4, simulation obtenue avec : J2 = 5,5 Hz, Jz = 1,8 Hz, J4 = 4 Hz.

L'appareillage utilisé est le même que celui qui est décrit au chapitre V, paragraphe 1.

Nous avons choisi de prendre une forte concentration d'adrénaline afin de diminuer le nombre des accumulations nécessaires. D'autre part il nous a été impossible d'étudier des solutions à concentrations plus élevées en protéine ; ceci en raison de leur faible stabilité à température ambiante. En effet, comme nous utilisons des molécules non enrichies en carbone 13, le temps d'accumulation nécessaire pour une seule valeur de t est d'environ 5 heures et ceci pour 100 accumulations seulement.

La séquence d'impulsions utilisées est la même que celle choisie pour le proton soit 180° - t - 90° - D (voir chapitre IV, paragraphe 2). Les basculements des spins à 180° et 90° correspondent à des durées d'impulsions de 44 et 22 µsec respectivement.

En l'absence d'HSA les temps de relaxation varient de 0,3 à 2 secondes. Ils sont plus élevés que dans le cas du proton puisque pour ce dernier, à une solution 0,5 M correspondent des temps de relaxation T_1 d'environ 0,2 seconde. T_1 décroît quand la concentration d'adrénaline augmente et la valeur correspondant à une solution 1 M serait voisine de 0,1 seconde.

Nous remarquons (Tableau 11) que c'est le carbone quaternaire (qui réalise la jonction entre les parties aromatique et aliphatique), qui possède le temps de relaxation le plus long. Ce dernier est en effet proportionnel à la puissance sixième de la distance séparant l'atome de carbone qui relaxe de l'atome d'hydrogène le plus proche.

Quand la concentration de protéine passe de 0 à 1%, les temps de relaxation de C_1, C_4, C_6 et C_7 (figure 25) augmentent, ceux de C_2 et C_5 diminuent, tandis que ceux de C_3, C_8 et C_9 restent inchangés. L'augmentation la plus importante se situe dans le voisinage des carbones porteurs de groupes hydroxyles.

La relaxation des carbones des groupements CH_3 et CH_2 est fortement influencée par la proximité de l'azote, ceci nous amène à ne pas considérer les variations des carbones C_1 et C_2. En conséquence nous pouvons dire que c'est le carbone C_5 lié au proton H_1 (en ortho de la chaîne, près des hydroxyles) qui est le plus "immobilisé" par l'approche de la protéine, puisqu'il est le seul dont le

Tableau 11 : Temps de relaxation T_1 des différents atomes de carbone de la molécule d'adrénaline en solutions 1 M à pH * 5,2.

% HSA	C_7 et C_6	C_4	C_5	C_8	C_9	C_3	C_2	C_1
0	0,94	1,88	0,40	0,36	0,29	0,50	0,36	0,72
1	2,60	2,60	2,71	0,36	0,36	0,50	0,29	1,44

temps de relaxation diminue quand on ajoute de l'albumine à la solution d'adrénaline.

Ce résultat confirme celui obtenu en RMN du proton. Si d'autre part, comme nous le supposons l'interaction a lieu par l'intermédiaire des hydroxyles phénoliques, il y a alors relâchement des liaisons C-OH pour les carbones C_6 et C_7 ce qui se traduit par une augmentation de leurs temps de relaxation respectifs.

3. Dichroïsme circulaire magnétique.

Le dichroïsme circulaire est lié à la différence d'absorption des deux composantes circulaires droite et gauche d'une lumière incidente à polarisation plane. Les deux vibrations résultantes d'amplitudes inégales conduisent à une polarisation elliptique dont on mesure l'ellipticité molaire.

Le dichroïsme circulaire magnétique est à rapprocher du phénomène de dispersion rotatoire magnétique.

La polarisation rotatoire magnétique fut découverte en 1846. Un corps transparent isotrope placé dans un champ magnétique produit une rotation du plan de polarisation d'un faisceau lumineux qui le traverse parallèlement à la direction du champ magnétique.

En dichroïsme circulaire magnétique on peut suivre ce phénomène d' assymétrie induite dans les régions d'absorption des solutés, sans être gêné par l' assymétrie induite dans les régions d'absorption du solvant.

a) Matériel et méthodes.

Les solutions de concentrations voisines de $4\ 10^{-5}$ M sont préparées dans le tampon phosphate suivant :

Na_2HPO_4, $12H_2O$: 15,7 g
NaH_2PO_4, $2H_2O$: 1,6 g
NaCl : 1,2 g
H_2O : qsp 1 litre

Nous avons ainsi préparé des solutions de chlorhydrates de dopamine, d'ephédrine et d'amphétamine choisis en raison de leur solubilité en milieu aqueux. La sérum albumine humaine est ensuite ajoutée sous forme de solution à 10% dans l'eau (soit 14.10^{-4} M).

Les spectres de dichroïsme circulaire naturel et de dichroïsme circulaire magnétique de la protéine et du ligand pris isolément sont soustraits du spectre enregistré avec le mélange des deux substances.

Le spectromètre utilisé est un Dichrographe II modifié pour permettre le passage du faisceau lumineux dans une bobine supraconductrice réalisée spécialement au CEN de Saclay. Il permet d'étudier le spectre de 135 mm à 610 nm dans un champ magnétique de 6,7 Teslas [38].

b) Résultat et discussion.

Au voisinage de la bande d'absorption du tryptophane J. PERRIN [39] avait observé un phénomène de dichroïsme circulaire magnétique important pour des molécules acides telles que la warfarine ou l'acide salicylique. Nos propres expériences ne nous ont pas permis d'observer de phénomènes similaires, peut être en raison du caractère basique de nos molécules.

VI- CONCLUSION GENERALE.

Nous avons tenté de comparer les données de l'ultrafiltration et de la RMN pour l'estimation de la constante de liaison du complexe adrénaline-albumine.

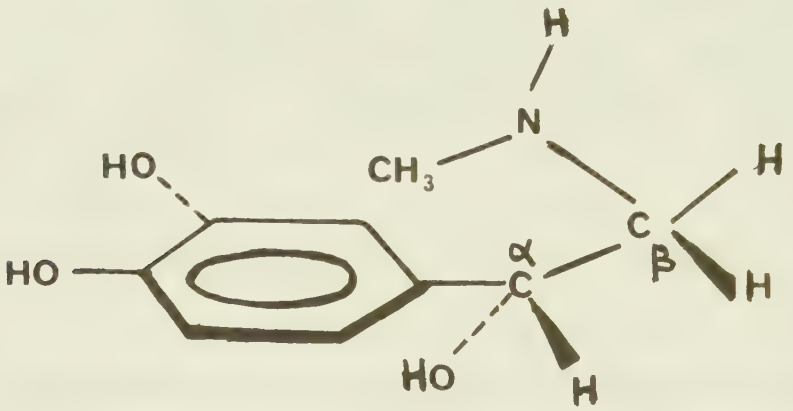
Par ultrafiltration la valeur calculée pour la dissociation est ; $K_d = 1,2.10^{-5}$ l/mole. Les affinités relatives des différents substrats étudiés : adrénaline, dopamine, tyramine trouvées par cette méthode sont en accord avec les résultats antérieurs obtenus par d'autres méthodes. La comparaison des valeurs numériques nous amène à penser que nous n'avons déterminé la constante que pour les sites de second ordre.

En RMN notre recherche s'est surtout orientée vers la détermination de la nature des sites de l'adrénaline qui interagissent avec l'HSA. Seuls les résultats obtenus pour une concentration de 0,1 M en adrénaline étaient quantitativement représentatifs du phénomène d'association, les autres résultats ne pouvaient être utilisés qu'à des fins qualitatives. Dans ces conditions et en tout rigueur la RMN donne seulement une limite supérieure pour K_D. L'ultrafiltration permet d'atteindre une plus grande précision. Les concentrations utilisées n'étant pas du même ordre de grandeur, il n'y a plus alors nécessité de travailler avec un rapport de concentration substrat/protéine élevé.

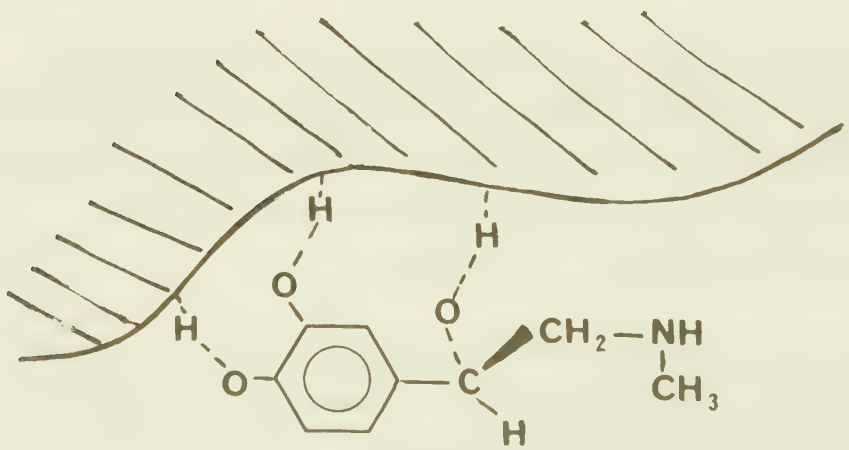
On remarque qu'une constante macroscopique telle que K_d échappe à la RMN (méthode locale) alors que l'ultrafiltration (méthode globale) permet une bonne évaluation de cette constante. Par contre la RMN apporte des données précises sur la nature des sites de l'adrénaline e trant en contact avec la protéine.

Nos résultats nous permettent de proposer un modèle pour la conformation d'interaction Adrenaline - HSA. La molécule d'adrénaline adoptant une conformation repliée que l'on pourrait appeler en "Scorpion". Les trois groupements hydroxyles sont situés du même côté du plan principal perpendiculaire au plan du cycle cathécol et passant par le carbone α. Dans cette position ils pointent à tous les trois vers une même direction qui est celle de la protéine.

Le noyau se trouve alors figé, la chaîne latérale restant plus mobile, n'est immobilisée que partiellement par l'intermédiaire du groupe OH situé en α du noyau.



Ce schéma certes approximatif ramène à la configuration gauche déterminée par Pullman (10), et conduit alors au schéma suivant pour le complexe adrénaline-albumine



Cette deuxième figure ne rend pas compte du repliement de la chaine au-dessus du noyau mais permet une bonne représentation de l'approche de la molécule d'albumine.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Y. COHEN, N. JULLIEN,
CR Soc. Biol. 5, 1040 (1971).

[2] A. DANON, J.D. SAPIRA,
J. Pharmacol. Exp. Ther., 182, 295 (1972).

[3] Y. COHEN, J. BRALET, J.P. ROUSSELET,
CR Soc. Biol., 162, 62 (1968).

[4] Y. COHEN, J. BRALET, W. JANIEC,
CR Soc. Biol., 162, 1320 (1968).

[5] M. ZIA, R.H. COX, L.A. LUZZI,
J. Pharm. Sci., 60, 89 (1971).

[6] B. BARGER, H. DALE,
J. Physiol., 41, 19 (1910).

[7] M. BEAUVALLET in Actualités pharmacologiques 8, 1 (1955),
Ed. : R. HAZARD, Masson (Paris).

[8] B. PULL MAN, J.H. COURRIERE, P. COURRIERE, J.P. GERVOIS,
J. Med. Chem., 15, 17 (1972).

[9] D. CARLSTRÖM, R. BERGIN, G. FALHENBERG,
Quant. Rev. Biophys., 6, 257 (1973).

[10] B. PULLMAN, H. BERTHOD, P. COURRIERE,
in Int. J. Quant. Chem, Quantum Biology Symposium N.°1 (1974).

[11] B. GLASSON in Actualités pharmacologiques 23, 109 (1970), Ed. : J. CHEYMOL, Masson (Paris).

[12] A. GOLDSTEIN, Pharmacol. Rev., 1, 102 (1949).

[13] M.T. MEUNIER, Thèse de Docteur de l'Université (Mention Pharmacie), Clermont-Ferrand (1961).

[14] G.N. RAMACHANDRAN, Int. J. Protein Res., 1, 5 (1969).

[15] G.N. RAMACHANDRAN, V. SASISEKHARAN, Adv. Protein Chem., 23, 283 (1968).

[16] P.F. SPAHR, J.T. EDSALL, J. Biol. Chem., 239, 850 (1964).

[17] F.W. PUTNAM, In the Proteins, 3 (1964), (H. Neurath ed.), Academic Press, New York

[18] G. FRANGLEN in Structure and function of plasma proteins, 1, 265 (1974) Ed.: A.C. ALLISON. Plenum Press, New York

[19] P. CALLAGHAN, N.H. MARTIN, Biochem. J., 83, 144 (1962).

[20] M. JIRGENSONS, Makromol. Chem., 91, 74 (1966).

[21] J.F. FOSTER in the Plasma Proteins, 1, 179 (1960), Ed. : F.W. PUTNAM Academic Press Inc. (New York).

[22] N. JULLIEN, Thèse de Doctorat de l'Université (Mention Pharmacie), Paris,(1970).

[23] H. PAULUS, Anal. Biochem., 32, 91 (1969).

[24] E. HEYDE, Anal. Biochem., 51, 61 (1973).

[25] N.F. BLATT, S.M. ROBINSON, H.J. BIXLER,
Anal. Biochem., 26, 151 (1968).

[26] E. RODRIGUEZ-FARRE, Y. COHEN,
Communication personnelle.

[27] W. Mc FARLANE, R.F.M. WHITE,
Techniques of high resolution N.M.R. Spectroscopy (1972).
Butterworths (London)

[28] M.L. MARTIN, G.J. MARTIN,
Manuel de Résonance magnétique nucléaire, (1971) Azoulay (Paris).

[29] G.C.K. ROBERTS, O. JARDETZKY,
Adv. Protein Chem., 24, 447 (1956).

[30] T.C. FARRAR, E.D. BECKER,
Pulse and Fourier Transform NMR Introduction to theory and methods (1971) Academic Press (New-York).

[31] B.D. SYKES,
Biochem. Biophys. Research Comm., 39, 508 (1970).

[32] O. JARDETZKY,
Adv. Chem. Phys., 7, 499 (1964).

[33] J.S. WAUGH in Molecular Relaxation Processes 113, (1966)
(M. Davies ed.) Chemical Society Special Publication n°20,
The Chemical Society, Academic Press (London)

[34] O. JARDETZKY, N.G. WADE-JARDETZKY,
Mol. Pharmacol., 1, 214 (1965).

[35] J.J. FISCHER, O. JARDETZKY,
J. Am. Chem. Soc., 87, 3237 (1965).

[36] G.C. LEVY, G.L. NELSON,
^{13}C Nuclear Magnetic Resonance for organic chemists (1972)
Wiley Interscience (New-York).

[37] J.B. STOTHERS,
Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1972)
Academic Press (New-York).

[38] R. BLONDET, D. RAPPANELLO, C. SCHNEIDER,
Proc. of the third International Cryogenic Engineering Conference, Berlin, 1970, 238. I liffe science and technology publications, Guilford.

[39] J. PERRIN,
Communication personnelle.

ANNEXE 1

SPECTROSCOPY LETTERS, 8(8), 509-520 (1975)

ON THE STRATEGY OF NMR SPECTRAL ANALYSIS. THE ^{1}H-NMR SPECTRUM OF AMPHETAMINE

By Françoise Lambert *, Michel Ellenberger ** §, and Yves Cohen *

* Laboratoire de Pharmacodynamie - ERA CNRS 277
Université de Paris-Sud, 92290 Chatenay-Malabry, France

** Département de Biologie - Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
B.P. 2, 91190 Gif-sur-Yvette, France

NMR / COMPUTER SIMULATION / AMPHETAMINE

ABSTRACT

The successive steps of the computer analysis of a NMR spectrum are examined. Better results can be obtained by direct simulation of tentative model spectra. As an example the ^{1}H-NMR spectrum of amphetamine is analysed.

For the practising NMR spectroscopist the analysis of an experimental spectrum is accomplished when this spectrum is exactly (or almost exactly) simulated with the data extracted from his analysis. Therefore the addition of a Lorentzian lineshape program to the spectrum calculating program was a decisive progress in the simulation procedure.

The usual steps in spectral analysis are :

1- Recognition of the type of the experimental spectrum from its appearence.

2- Decomposition of the experimental spectrum into a line spectrum.

3- Tentative assignment and determination of a trial parameter set (chemical shifts and coupling constants).

§ to whom correspondence should be addressed

Copyright © 1975 by Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved. Neither this work nor any part may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, microfilming, and recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

4- Calculation of a theoretical spectrum.

5- Adjustment of the theoretical to the experimental spectrum.

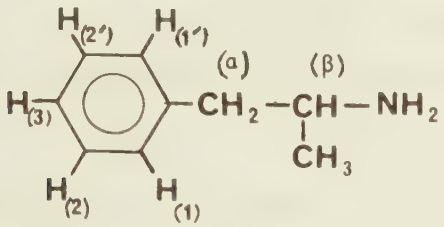
In very complex spectra the main difficulty arises from the width of the experimental peaks which is the integrated sum of many transitions. This fact precludes an unambiguous decomposition of the experimental spectrum (step 2) as well as a judicious choice of a few significant calculated transition lines for the iteration procedure (step 5). However, computer analysis of complex spectra obtained without iterative refinement have been reported recently [1-3]. Lately, we succeeded in the analysis of strongly coupled spectra [4] by combining the LAOCN 3 [5] with a line shape program following a predetermined protocol. Here we attempt to conceptualize our simple and (in our experience) time saving approach which has the advantage of shortening step 5 and focusing the attention on the spectroscopic parameters (chemical shifts and coupling constants) rather than on the transition energies. As an exemple we present the analysis of the extended scale ^{1}H spectrum of amphetamine, (see formula on table 1) the aromatic part of which has not yet been analysed.+ There are about 3000 transitions in this part of the spectrum.

The "classical" method [10] and our method are schematized in the flow-diagram of figure 1. The comparison shows that the crucial point of both strategies lies in different stages. In the "classical" way the convergence of the iteration is the decisive test for the assignments and the initial parameter set. The transition energies are modified until the convergence is reached. But in complex spectra even the convergence is not a sufficient criterion for the accuracy of the analysis. It may happen that the final simulation would reveal a poor agreement with the experimental spectrum. In the method here presented the decisive

+ For the aliphatic part of this molecule see [6-9]

Table 1 : Chemical shifts (first row) and coupling constants for aromatic protons of amphetamine. (δ in ppm and Hz at 90 MHz relative to internal DSS,J in Hz.)

The chemical shifts in Hz are given at 90 MHz for the sake of comparison with our precedent paper 4).



	H_2	$H_{2'}$	H_3	H_1	$H_{1'}$	H_{a_1,a_2}	
Hz	668.28	668.28	662.70	658.63	658.63	—	
ppm	7.43	7.43	7.36	7.32	7.32	—	
		1.50	7.50	7.65	0.60	0	H_2
			7.50	0.60	7.65	0	$H_{2'}$
				1.10	1.10	0	H_3
					1.90	0.40	H_1
						0.40	$H_{1'}$

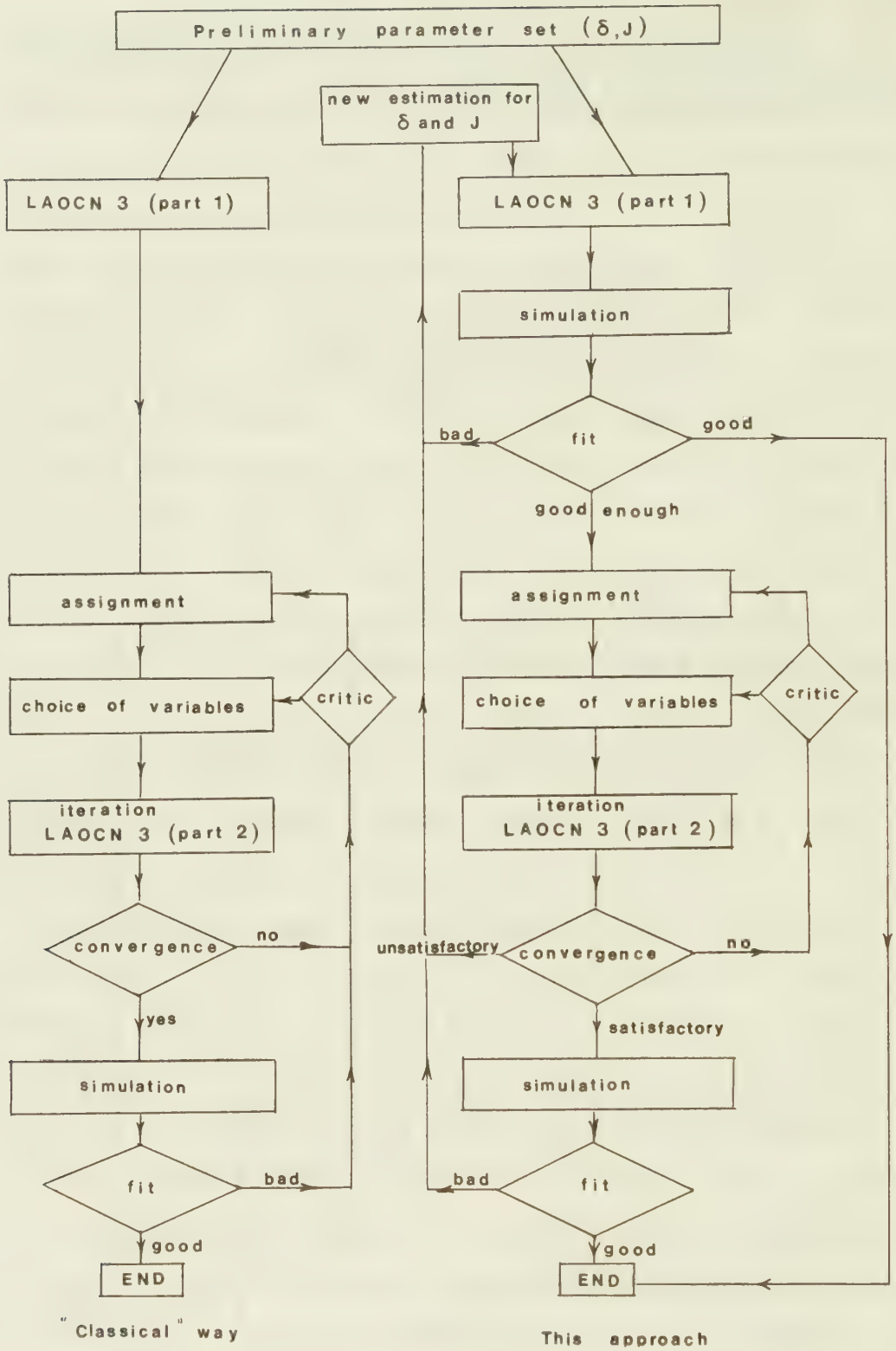


Figure 1 : Flow diagram of computer simulation.

test is the simulation of the tentative model spectrum before the assignments are made. By means of a step-by-step simulation we approach the experimental spectrum (see below the protocol of this approach) and then only submit a model spectrum to the iteration prodedure. If satisfying simulation has already been obtained for parts of the spectrum the iteration may be run for subspectra alone.[++]

One could object that this approach consists in progressive guessing reasonable spectral parameters. But this is also true for the "classical" approach where a choice of a few critical lines for the iteration has to be made. And this assignment process is somewhat abstract whereas in the here presented procedure the successive steps give increasing insights in the spectrum structure. For the chemist concerned with practical molecular structure problems this could be more important than searching the exact solution of the Hamiltonian matrix. Another difference between the two strategies lies in the estimation of the non convergence causes. In the iterative part of LAOCN 3 the failure of a data set does hardly suggest a better set, whereas the systematic use of the simulation progressively reveals the relationship between the input parameters and the spectral envelope. By the described method the first two steps of the spectral analysis (recognition and decomposition of the experimental spectrum) lead already to a convenient model spectrum. Systematic errors are avoided by proceeding in the below given order.

1- Recognition of the splitting patterns from an "extended X approximation". The spectrum is simulated by assuming plausible ^{3}J values and large chemical shifts between the nuclei (independent spins hypothesis). Then, a series of spectra is simulated with different chemical shift sequences of the nuclei.

[++]As part of a sophisticated computer system for NMR, a program (VARIOS) has been written for step-wise variations of initial values.[11)]

The chemical shift are brought nearer. The overall aspect of the experimental spectrum is obtained for only one sequence. The assignments are found together with the chemical shifts.

As a matter of fact the shape of the subspectral part belonging to each spin i depends more on the prevailing perturbation parameter $\lambda_{ij} = \frac{J_{ij}}{\delta ij}$ involving this spin [12] than on the coupling to the neighbouring spins .[+++]. During this stage the simulated linewidth is kept slightly smaller than the experimental one for a better understanding of the shape composition.

2- The vicinal coupling constants are now adjusted one after another in decreasing order of magnitude by variations between a maximum and a minimum value. The spectral incidence of each correction appears clearly as do the uncertainties. During this stage and the next ones the simulated linewidth is kept equal to the experimental linewidth.

3- At this stage the limits of vicinal coupling adjustments become evident. Residual discrepancies are confined by introduction of long range coupling constants.[14]

Of course the efficiency of the presented method depends on the likelihood of the preliminary parameter set. For molecules of known formula one could use the empirical rules for chemical shift and coupling constants and the analogy of related molecules owing to the daily growing NMR spectral library. For unknown molecules the development of interactive search programs could make the first structure proposal easier.[15) 16)]

Finally, as an a posteriori test of the obtained simulation the spectrum has been simulated at another frequency [10, 17] without changing

[+++] An ingenious method of empirical analysis based on the distinction of characteristic splitting patterns has been given by Zanger for aromatic compounds.[13]

the final parameters and compared to the respective experimental spectrum.

It is understood that the experimental spectrum to be simulated must be carefully selected, especially the effect of the sweep direction on the relative peak height (roof effect) has to be checked.

We would point out an observation. A careful comparison with the model spectrum reveals in the experimental spectrum small local variations of the peak width some of which are clearly due to relaxation effects (other causes would involve exchange effects or hidden long range coupling). Therefore, by recording a set of spectra with increasing values of the radiofrequency field H_1, and comparing them with a set of the same model spectrum plotted with different Lorentzian linewidths one would be able to measure different T_1 relaxation times, thus making the progressive saturation method [18] usable in complex spectra.

The ^{1}H-NMR Spectrum of Amphetamine

The sample was a 0.25M D_2O solution of amphetamine sulfate at PH* 4.0 (uncorrected value). Internal standard was sodium-2,2-dimethyl-2 silapentane-5 sulfonate (DSS). Sample temperature was 21° C.

Spectra were run internally locked, at 250 MHz on a CAMECA spectrometer and at 90 MHz on a BRUKER HX 90. The whole spectrum is of the type

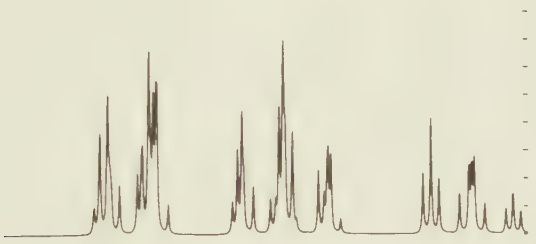


Figure 2 : 250 MHz simulated spectrum of the aromatic protons of amphetamine in the "extended X approximation". Chemical shift sequence in any order (here : $\delta_{H_{1,1'}} > \delta_{H_{2,2'}} > \delta_{H_3}$)

$AA'BCC'MNN'Z^3$ where AA'BCC' is its aromatic and $MNN'Z^3$ its aliphatic part, which is of the first order. The simulation analysis has been done for the aromatic part of the expanded 250 MHz spectrum (by taking into account the coupling to the α methylene protons).

1- For the preliminary set we started from the coupling values of t-butylbenzene [19] empirically corrected for substitution effects [20]. The The "extended X approximation" spectrum is displayed on figure 2 with the following (false) chemical shift sequence : $\delta_{H_{1,1'}} > \delta_{H_{2,2'}} > \delta_{H_3}$. The intramolecular chemical shifts were reduced and all six sequence combinations attempted. Rough agreement was only obtained for the sequence : $\delta_{H_{2,2'}} > \delta_{H_3} > \delta_{H_{1,1'}}$ (figure 3).

2- By keeping the para coupling equal to zero, first the ortho, then the meta coupling were adjusted on the 5-spins matrix. The specific effect of the variation of <u>one</u> coupling constant was observed as relative peak height and shouldering in the corresponding splitting part.

3- The introduction of the para coupling $J_{H_1H_{2'}} = J_{H_{1'}H_2}$ on the 7-spins matrix modified typically the spectrum shape on the left side and on the

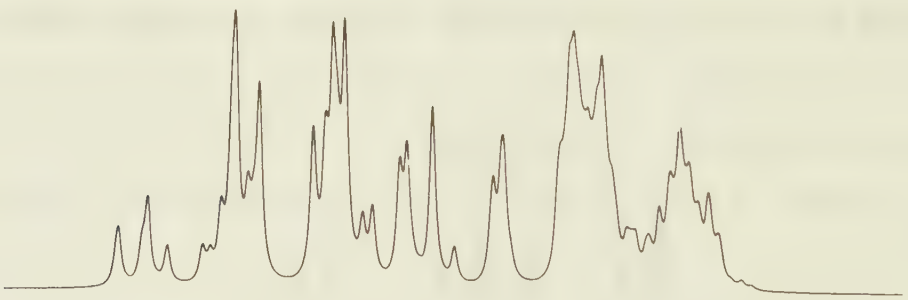


Figure 3 : 250 simulated spectrum of the aromatic protons of amphetamine. Chemical shifts in the definitive order ($\delta_{H_{2,2'}} > \delta_{H_3} > \delta_{H_{1,1'}}$), assumed linewidth : 0.5 Hz.

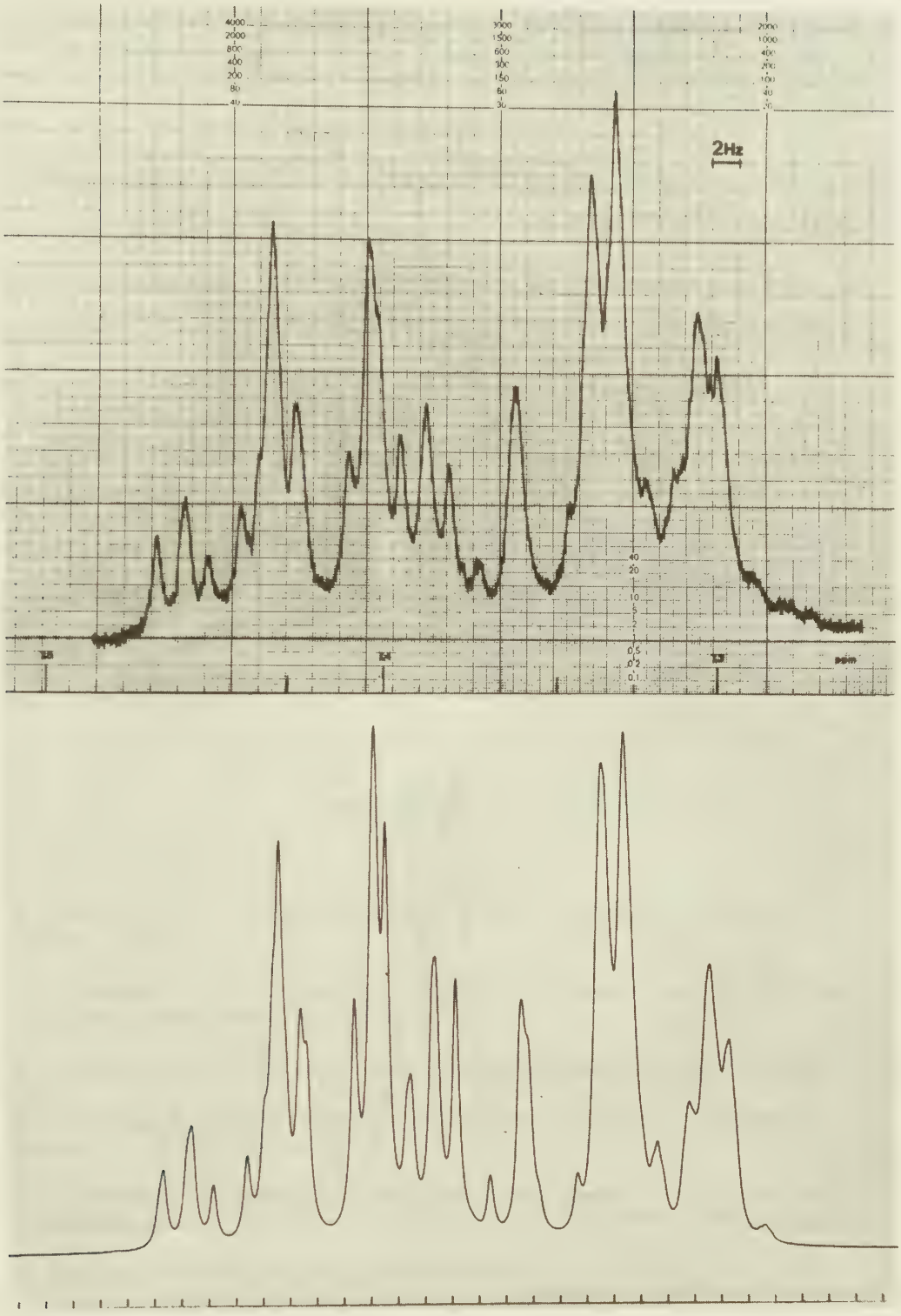


Figure 4 : 250 MHz spectrum of the aromatic protons of amphetamine.
Above : experimental spectrum, below : simulated spectrum
with an assumed line width of 0.6 Hz.

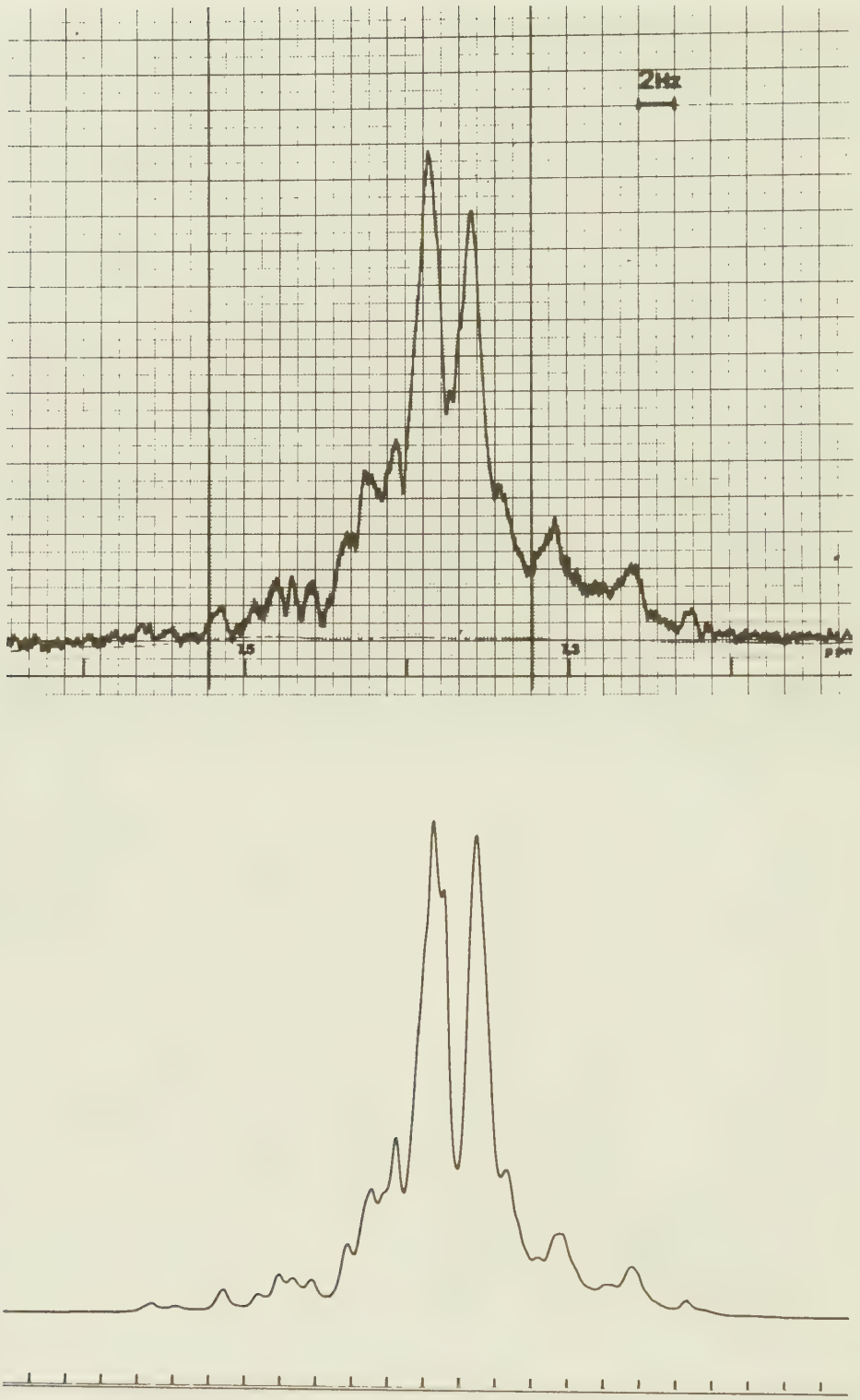


Figure 5 : 90 MHz spectrum of the aromatic protons of amphetamine above : experimental spectrum, below : simulated spectrum with an assumed line width of 0.6 Hz.

"$H_{1,1'}$part". The long range coupling $J_{H_1H_\alpha} = J_{H_1'H_\alpha}$ was now obtained. The final result is reproduced on figure 4 together with the experimental spectrum and the values are given in Table 1.

As a test the spectrum has been simulated at 90 MHz with the same parameters (the only change was the verticale scale adjustment). As shown on figure 5 the simulation agrees well with the experimental spectrum. The uncertainties are estimated to ± 0.5 Hz for the chemical shifts at 250 MHz (± 0.002 ppm) and ± 0.1 Hz for the coupling constants.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a grant from CNRS (ATP n° 5074).
We thank Dr. L. Pogliani for stimulating discussions and Drs. Tran-Dinh-Son, J. Thiéry, E. Bengsch, W. Haar, and M. Roux for critical reading of the manuscript and helpful comments.

REFERENCES.

1) J.W. Emsley, S.R. Salman, and R.A. Storey, J. Chem. Soc. (B), (1970), 1513.

2) R.J. Abraham, M.A. Cooper, H. Indyk, T.M. Siverns, and D. Whittaker, Org. Magn. Resonance. 5, 373 (1973).

3) F. Cavagna, and A. Groebel, Org. Magn. Resonance. 5, 133 (1973)

4) F. Lambert, M. Ellenberger, L. Merlin, and Y. Cohen, Org. Magn. Resonance, (1975) in press.

5) A.A. Bothner - By and S.M Castellano, in : Computer Programs for Chemistry, Vol 1, ed. D.F. Detar (Benjamin, New-York, 1968), chap. 3

6) K. Bailey, J. Pharm Sci. 60, 1232 (1971).

7) K. Bailey, A.W.By, K.C. Graham, and D. Verner, Canad. J. Chem. 49, 3143, (1971).

8) G.A. Neville, R. Deslauriers, B.J. Blackburn, and I.C.P. Smith, J. Med. Chem. 14, 717 (1971).

9) G.E. Wright, Tetrahedron Lett. (1973), 1097.

10) R.J. Abraham, The Analysis of High Resolution NMR Spectra (Elsevier, Amsterdam, (1971) Chap. 5

11) E.G. Hoffman, W. Stempfle, G. Schroth, B. Weimann, E. Ziegler, and Brandt, Angew. Chem. Internat. Edit. 11, 375 (1972).

12) R.A. Hoffman, S. Forsèn, and B. Gestblom, in NMR, P.Diehl, E. Fluck, and R. Kosfeld eds. (Spinger, Berlin, 1971), 5, I.

13) M. Zanger, Org. Magn. Resonance 4, 1 (1972).

14) L. Pogliani, Spectr. Lett. (1975), in press.

15) S.R. Heller and R.J. Feldmann, J. Chem. Educ. 49, 291 (1972).

16) S.I. Sasaki, H. Abe, T. Ouki, M. Sakamoto, and S. Ochiai, Anal. Chem. 40, 2220, (1968).

17) V. Spirko and J. Pliva, J. Mol. Spectr. 29, 426, (1969).

18) E.G. Finer and R.K. Harris, Chem. Comm. (1969), 42.

19) S. Castellano and R. Kostelnik, Tetrahedron Lett. (1967), 5211

20) S. Castellano and C. Sun, J. Amer. Chem. Soc. 88,4741 (1966).

Received May 9, 1975

Accepted June 11, 1975

ANNEXE 2

Organic Magnetic Resonance, 1975, Vol. 7, pp. 266 to 273

NMR Study of Catechol and some Catecholamines

Françoise Lambert,
Laboratoire de Pharmacodynamie, ERA CNRS 277,
Université de Paris-Sud 92290 (Châtenay-Malabry), France

Michel Ellenberger*
Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay,
Boîte Postale N° 2, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Louis Merlin and Yves Cohen
Laboratoire de Pharmacodynamie, ERA CNRS 277,
Universitè de Paris-Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France

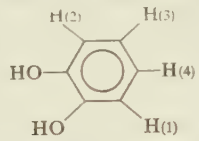
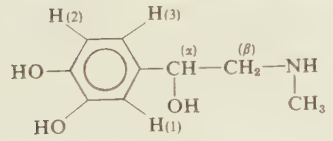
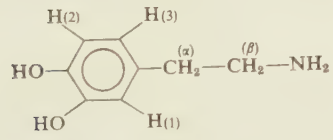
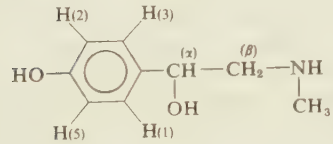
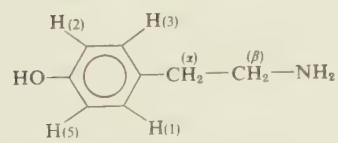
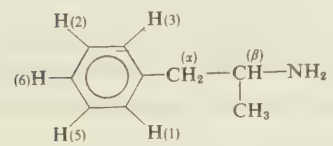
Received 19 September 1974; accepted 10 February 1975)

Abstract—The proton magnetic resonance spectra of catechol, epinephrine, dopamine, synephrine, tyramine and amphetamine have been analysed by computer simulation. The chemical shifts and coupling constants are discussed, with their molecular implications. Convenient parameters are introduced for the additivity of substituent effects on chemical shifts of aromatic protons. The additivity rule of coupling constants is extended to these compounds.

SINCE the binding of catecholamines to serum albumin has been experimentally recognised,[1–3] the question arises of determining which portion of the molecule is involved in the binding to the protein.[4] Danon and Sapira[5] conclude from equilibrium gel filtration and direct ultrafiltration experiments that there is a specific affinity of the catechol ring for the protein, whereas Zia *et al.*[6] suggest from NMR data that the alkyl sidechain of epinephrine is the active site for binding to serum albumin.

We have undertaken an investigation by proton magnetic resonance (^{1}H NMR) of the interaction of epinephrine and related compounds to human serum albumin. The binding of catecholamine to the protein would be expected to alter the chemical shift of the

TABLE 1. COMPOUNDS INVESTIGATED

Formula	Name	Origin	Concentration	pH*
	Catechol	Fluka	0·20 M	2.4
	Epinephrine	K & K	0·10 M[a]	1·2 to 7·1
	Dopamine hydrochloride	Sigma	0·25 M[a]	7·4
	Synephrine	Sigma	0·20 M[a]	0·2
	Tyramine	Sigma	0·20 M[a]	0·8
	Amphetamine sulphate	Prolabo	0·25 M[a]	4·0

[a] Sodium sulphite was added to prevent rapid oxidation.
Note: For the sake of simplicity the numbering of the aromatic protons is kept constant for all compounds.
*Author to whom correspondence should be addressed.

© Heyden & Son Limited.
Printed in Northern Ireland.

protons near the binding site on the small molecule and to broaden selectively the spectral lines of these protons. The modification of the charge distribution on the molecule would also possibly induce small variations in the coupling constants. Thus, our first purpose was to calculate these NMR parameters with the best possible accuracy for a series of catecholamines and related compounds in aqueous solution. We report the first results in this paper.

For simplicity the numbering of the aromatic protons is kept constant throughout the whole series (see Table 1).

EXPERIMENTAL

The following chemicals were obtained commercially and used without further purification; catechol, epinephrine, dopamine, synephrine, tyramine and amphetamine (see Table 1).

The solutions were 0.1 or 0.2 M in D_2O. Titrations were carried out with concentrated DCl and NaOD. The pH* values are uncorrected meter readings (see Table 1).

The ^1H NMR spectra were recorded at 90 MHz on a Bruker HX-90 spectrometer and at 250 MHz on a Cameca TSN-250 spectrometer. Probe temperature was 24 °C in the 90 MHz instrument and 22 °C in the 250 MHz instrument. The spectra were recorded internally locked with 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonic acid (DSS) as internal standard. It was first checked that the addition of DSS had no influence on the spectra.

FIG. 1. (A) 90 MHz spectra of epinephrine in D_2O solution, pH* 1.2; (a) Experimental spectrum; (b) Computer simulated spectrum (assumed linewidth, 0·5 Hz).

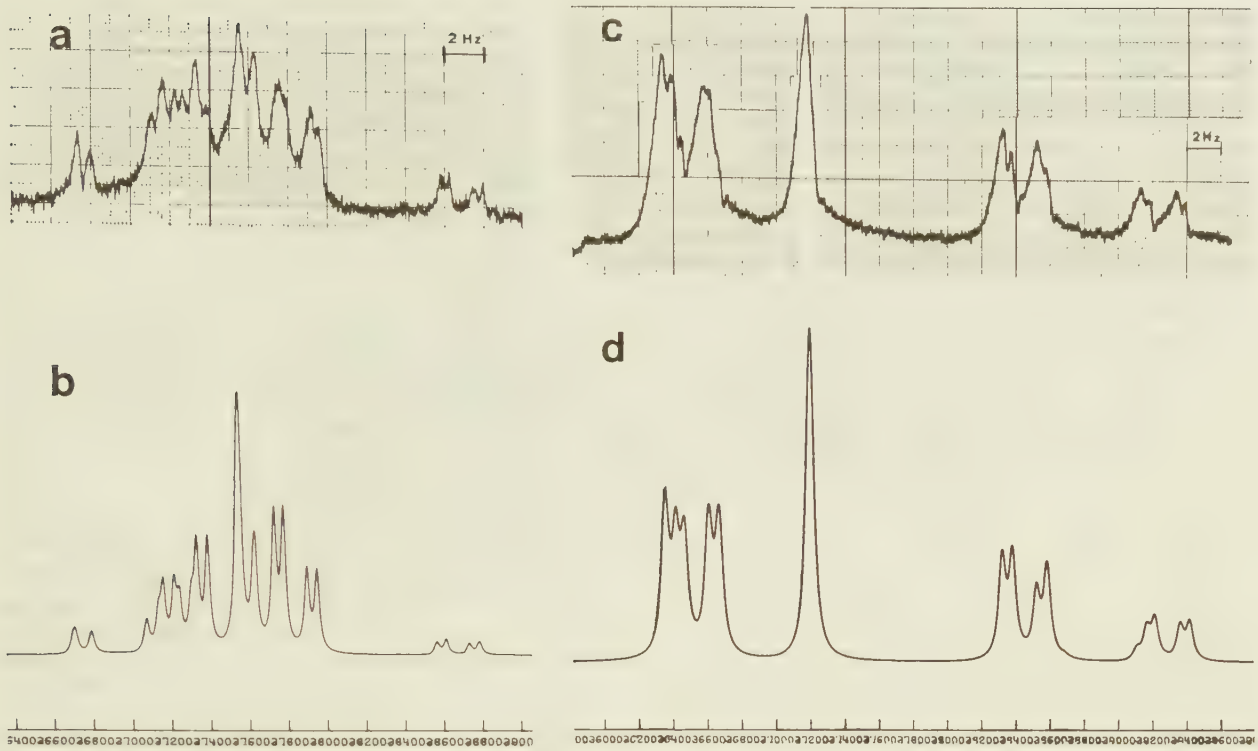


Fig. 1. (B) Expanded spectra of the aromatic region; (a) Experimental spectrum at 90 MHz; (b) Computer simulated spectrum at 90 MHz (assumed linewidth, 0·3 Hz); (c) Experimental spectrum at 250 MHz; (d) Computer simulated spectrum at 250 MHz (assumed linewidth, 0·5 Hz).

After a preliminary analysis the spectra were simulated at both frequencies on a PDP-12 computer using the NMRSIM program. The LAOCN3 program, supplemented with a Lorentzian line shape curve plotting program, was then used.[7] The analysis of the spectra at two frequencies[8] is helpful for removing uncertainties in the iteration process, since the chemical shifts are frequency dependent, whereas the coupling constants are frequency independent.

For catechol, the spectrum was first analysed by hand following the procedure given by Abraham for *ortho*-dichlorobenzene.[9] The result of this calculation gave the input parameters for theL AOCN3 program.

The uncertainties of the NMR parameters are 0.1 Hz for chemical shifts and 0·05 Hz for coupling constants.

Mean values of shielding parameters were calculated on a PDP-12 computer.

RESULTS

As an example of the fitting procedure we reproduce in Fig. 1A the experimental and simulated spectra of epinephrine at 90 MHz, and in Fig. 1B, the corresponding expanded spectra of the aromatic region at 90 and 250 MHz. Figure 2 gives the same comparison for catechol at 250 MHz on an expanded scale. For a better insight into the spectral structure a slightly narrower linewidth than the experimental one has been taken for the simulated spectra.

Chemical shifts and coupling constants of epinephrine and catechol are reported in matrix form in Tables 2 and 3, respectively. For the six compounds studied in this paper the assignments of the chemical shifts to the individual aliphatic protons are obvious. For the aromatic protons the chemical shifts are presented in diagrammatic form in Table 4. They are discussed below with the help of the empirical chemical shift rule.[10,11] Calculated parameters are listed in Table 5.

The study of the epinephrine spectrum as a function of pH* showed no noticeable variation of chemical shifts and coupling constants between pH* 1·2 and 7·1. The chemical shift variation was less than 2 Hz for the aliphatic protons and less than 1 Hz for the ring protons. Nevertheless, in the characteristic doublet of the methylene group the low field peak splits into two around pH* 5·0 as shown in Fig. 3, the distance between the two low field peaks being less than 1 Hz. Above pH*7 epinephrine is rapidly oxidised and precipitates out of the solution.

Table 2. Chemical shifts (first row) and coupling constants of epinephrine (δ in ppm and Hz at 90 MHz relative to internal DSS, J in Hz)

	Aromatic			Aliphatic			
	$H_{(1)}$	$H_{(2)}$	$H_{(3)}$	$H_{(\alpha)}$	$H_{(\beta)}$	N–CH_3	
Hz	627·55	626·45	619·55	445·75	296·0	251·0	
ppm	6·97	6·96	6·88	4·95	3·29	2·79	
		0·40	2·20	0·60	0	0	$H_{(1)}$
			8·30	0	0	0	$H_{(2)}$
				0·60	0	0	$H_{(3)}$
					6·50	0	$H_{(\alpha)}$
						0	$H_{(\beta)}$

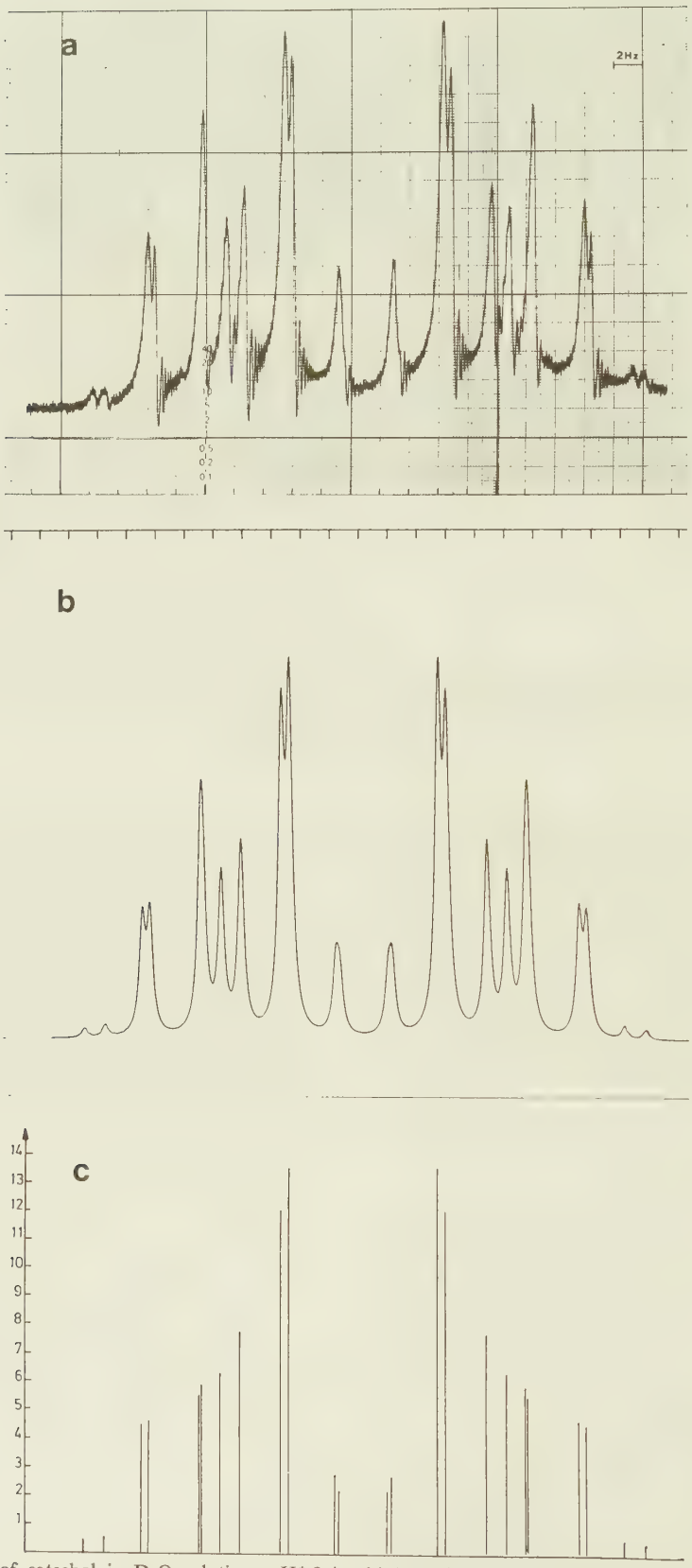


FIG. 2. 250 MHz spectra of catechol in D_2O solution, pH* 2.4; (a) Experimental spectrum; (b) Computer simulated spectrum (assumed linewidth, 0·5 Hz); (c) Calculated line spectrum.

Table 3. Chemical shifts (first row) and coupling constants of catechol (δ in ppm relative to internal DSS, J in Hz)

$H_{(1)}$	$H_{(2)}$	$H_{(3)}$	$H_{(4)}$	
6·96	6·96	6·88	6·88	
	0·65	1·67	7·93	$H_{(1)}$
		7·93	1·67	$H_{(2)}$
			7·59	$H_{(3)}$

Table 6 displays the coupling constants in the aromatic and the aliphatic regions for all the compounds studied. The long range coupling constant J_{12} which appears between the ring protons in *para* position is reported for all molecules.

DISCUSSION

Chemical shifts

Table 4 shows the effect of the substituents on the chemical shift of the aromatic protons. As compared with the benzene protons ($\delta = 7{\cdot}27$ ppm) there is a small low field shift for the monosubstituted benzene derivative amphetamine. The *meta* protons H_2 and H_5 resonate at lower field than H_1 and H_3.

For all compounds with a catechol ring an important shift towards high field should be noted. Moreover, synephrine and tyramine which are *p*-disubstituted benzenes, show a marked separation between two groups of protons: H_2, H_5 on the one hand and H_1, H_3 on the other hand. The repulsive action of the hydroxyl on the π electrons clearly accounts for the relative low field shift of H_1 and H_3, situated in the *meta* position with respect to OH. Thus, the hydroxyl group has a stronger effect than the aliphatic chain.

Following Zanger,[11] we propose an additivity relation to calculate the chemical shift of the aromatic protons:

$$\delta_H = \sigma_m + \sigma_{m'} + \sigma_p + \sigma_o + \sigma_{o'} + 7{\cdot}27 \text{ (in ppm)}$$

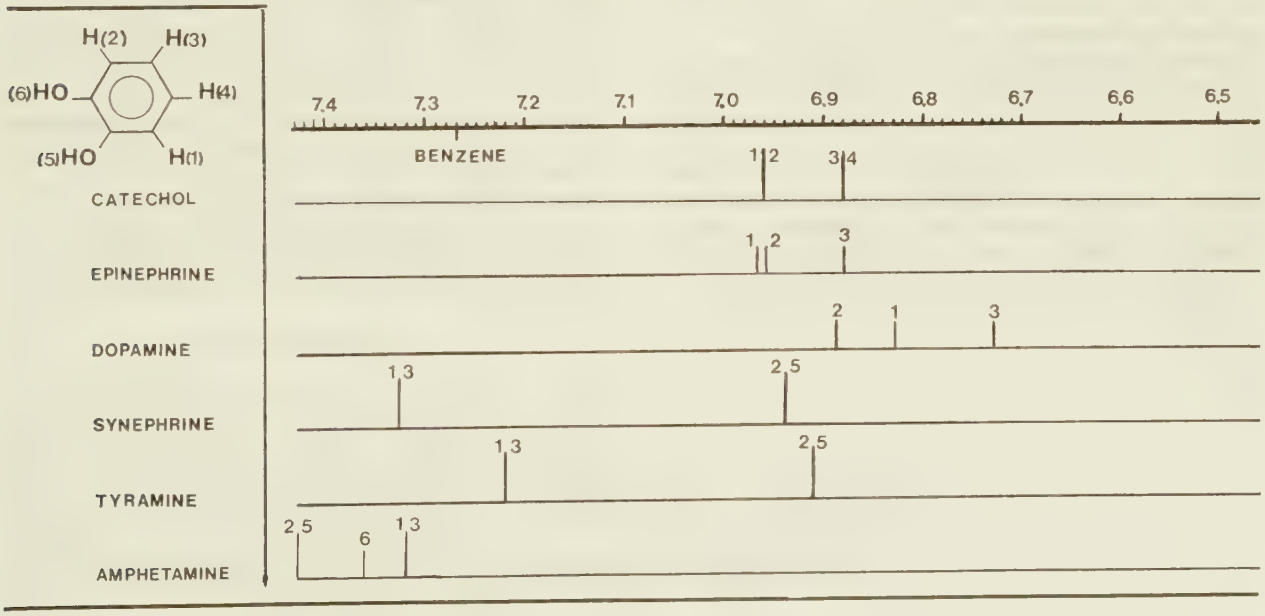
Here σ_o, $\sigma_{o'}$, σ_m, $\sigma_{m'}$, σ_p are the shielding parameters for the substituents other than hydrogen, which are in *ortho*, *meta* and *para* position to the proton under consideration. The mean values of these parameters for four substituents are reported in Table 5. The coefficient σ_m is always larger than the others, except for the alcoholic chain. This is the reason for the observed inversion between the chemical shift of H_1 and H_2 in epinephrine and dopamine. We find that σ_p is smaller than σ_o for the OH substituent, unlike the findings of Jackman *et al.*,[10] who gave the values $\sigma_o = -0{\cdot}5$ and $\sigma_p = -0{\cdot}4$. Our values are confirmed by the simulation of three molecules: catechol, epinephrine, dopamine.

Table 5. Shielding parameters for calculation of the chemical shifts (in ppm). Accuracy 0·02 ppm

Substituents	σ_m	σ_p	σ_o
OH	+0·03	−0·44	−0·35
CH_2—$CH(CH_3)$—NH_2	+0·16	+0·09	+0·05
CH_2—CH_2—NH_2	−0·03	—	−0·11
$CH(OH)$—CH_2—$NH(CH_3)$	+0·017	—	+0·023

In the spectrum of epinephrine we observe a splitting of the low field peak of the methylene doublet near pH* 5. For other pH* values this peak is broader and lower than the high field one; it has the appearance of an unresolved doublet. Simulation allows an evaluation of the *trans* and *gauche* coupling constants between the two non-equivalent protons in the β position and the proton on the alcoholic group in the α position, respectively. This effect has been observed by Ison *et al.*[12] and interpreted as resulting from a preferred conformation of the aliphatic chain under certain pH* conditions. As discussed,[12] among all three rotamers (Fig. 4), the preferred one is rotamer II in which the amino group is *trans* to the aromatic ring and *gauche* to the hydroxyl group. This preference is largely due to an electrostatic and/or hydrogen bonding interaction

Table 4. Chemical shifts of the aromatic protons (in ppm from internal DSS)



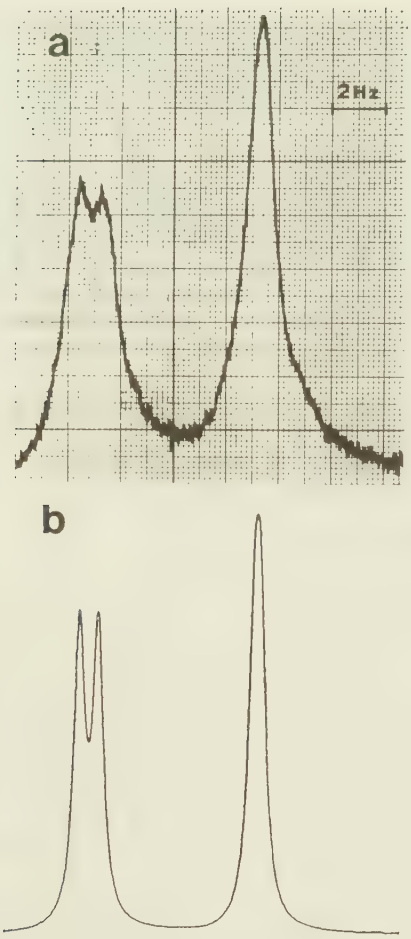


FIG. 3. 250 MHz spectra of epinephrine in D_2O solution pH* 5.2 (methylene protons absorptions): (a) Experimental spectrum; (b) Computer simulated spectrum (assumed line-width, 0·5 Hz). RMS error = 0·06, $\delta_2 - \delta_1 = 0{\cdot}41$ Hz, $J_1 = 6{\cdot}83$ Hz, $J_2 = 6{\cdot}24$ Hz.

between the amino and the hydroxyl groups at low pH* when the nitrogen is positively charged.

Spectral simulation has shown that the observed splitting of the low field peak of the methylene absorption at pH* 5·2 is ten times smaller than the splitting reported by Ison *et al.* at low pH*. Therefore, the same type of interaction cannot account for both patterns. In order to elucidate this point, additional experiments should compare the pH* dependent spectra of aromatic primary, secondary and tertiary amines. The effect of cyclisation of catecholamines by air oxidation should also be studied.

Coupling constants

Table 6 gives the coupling constants for catechol, amphetamine, and some mono- and dihydroxy molecules. Thus, we can set up an empirical relation between the coupling constants and the effect of the substituents.

A general increase in the coupling constants J_{13} and J_{23} is observed when the aliphatic chain substitutes for the H_4 proton. This effect would be expected as a result of the repulsive action of the sidechain on the π electron system of the ring.

The comparison between the coupling constants of the *meta* protons on the monohydroxy compounds synephrine and tyramine shows that J_{25} is larger than J_{13}, which means that the repulsive effect of the OH group is more important than that of the aliphatic chain.

The effect of the substituents can be summarised by an additivity relation. Such a relation has been proposed by de Kowalewski *et al.*[13,14] for the coupling constants of trisubstituted benzenes according to Dischler's views.[15] In this paper we give the appropriate parameters for substituent effects in α position of the sidechain.

The coupling constants between aromatic protons of the reported molecules can be calculated by use of the equation

$$J_{mn}^{ABC} = J_{mn}{}^{o} + E_{mn}{}^{A} + E_{mn}{}^{B} + E_{mn}{}^{C}$$

where J_{mn} is the coupling constant between the protons at positions m and n in the molecule with the substituents A, B, and C at positions 6, 5 and α, respectively. $J_{mn}{}^{o}$ is the coupling constant between the m and n protons in the unsubstituted molecule (amphetamine). $E_{mn}{}^{X}$ stands for the 'effect' of the substituent on the mn coupling.

The values of $E_{mn}{}^{X}$ and $J_{mn}{}^{o}$ are reported in Table 7. They have been averaged over all possible sets of linear combinations of the substituent parameters. The rule is valid for tri-, di- and monosubstituted molecules in A and B and/or C position.

For the aliphatic chain the observed coupling constants between protons in the α and β positions are averaged over all rotamers. This point has already been analysed.[12] The coupling constants reported here (Table 6) are averaged values over the *trans* and *gauche* constants for each rotamer. They are consistent with the results of Ison *et al.*[12]

For compounds with a hydroxyl group in the α position the average of the α, β coupling is 1 Hz smaller than for α unsubstituted compounds. This observation shows the attractive effect of the hydroxyl group on the σ electrons.

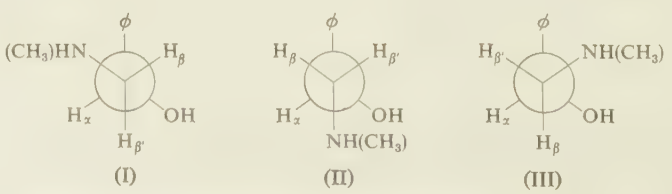
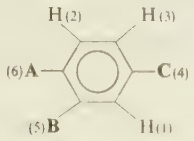
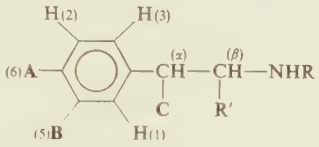


FIG. 4. Rotamers of epinephrine.

Table 6. Coupling constants (in Hz)



Name	A	B	C	J_{12}	J_{13}	J_{25}	J_{23}	J_{34} or J_{26}
Catechol	OH	OH	H	0·65	1·67	—	7·93	7·59
Epinephrine	OH	OH	CH(OH)—CH_2—NH(CH$_3$)	0·40	2·20	—	8·30	—
Dopamine	OH	OH	CH_2—CH_2—NH_2	0·25	2·10	—	8·10	—
Synephrine	OH	H	CH(OH)—CH_2—NH(CH$_3$)	0·50	2·25	2·85	8·30	—
Tyramine	OH	H	CH_2—CH_2—NH_2	0·40	2·20	2·90	8·30	—
Amphetamine	H	H	CH_2—CH(CH_3)—NH_2	0·60	1·90	1·10	7·65	7·50
					J_{16} = 1·50			



Name	A	B	C	$\langle J_{3\alpha}\rangle = \langle J_{1\alpha}\rangle$	$\langle J_{\alpha\beta}\rangle$
Epinephrine	OH	OH	OH	0·60	6·50
Dopamine	OH	OH	H	0·40	7·40
Synephrine	OH	H	OH	0·50	6·50
Tyramine	OH	H	H	0·50	7·30
Amphetamine	H	H	H	0·40	~7·00

Table 7. Values in Hz of the substituent effects for the additivity relation

	J_{mn} coupling		
	J_{12}	J_{13}	J_{23}
E_{mn}^{A}	−0·213	−0·288	+0·60
E_{mn}^{B}	−0·125	−0·075	−0·10
E_{mn}^{C}	+0·125	+0·075	+0·10
J_{mn}^{O}	0·60	1·90	7·65
Error	0·011	0·013	0·04

CONCLUSIONS

The chemical shifts and coupling constants are given for six related molecules in aqueous solution: catechol, epinephrine, dopamine, synephrine, tyramine and amphetamine. The qualitative dependence of these NMR parameters on the electronegativity of the substituents is expressed by additivity rules for which convenient coefficients are given. A better insight into the charge distribution of these pharmacologically important molecules is obtained. This is a preliminary approach to the study of the binding sites of these amines with proteins.

Acknowledgements—It is a pleasure to thank Dr L. Pogliani for his skilful advice on the use of the computer programs and many helpful discussions. We wish to thank Dr J. Thiéry for his collaboration in the computational work. We are grateful to Dr G. C. K. Roberts for providing a preprint of his article.

REFERENCES

1. G. J. Litt, *Dissertation Abstr.* **23,** 1936 (1962).
2. H. N. Antoniades, A. Goldfien, S. Zilleli and F. Elmadjian, *Exp. Biol. Med.* **97,** 11 (1958).
3. Y. Cohen, J. Bralet and J. P. Rousselet, *Compt. Rend. Soc. Biol.* **162,** 62 (1968).
4. Y. Cohen and N. Jullien, *Compt. Rend. Soc. Biol.* **165,** 1040 (1971).
5. A. Danon and J. D. Sapira, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **182,** 295 (1972).
6. H. Zia, R. H. Cox and L. A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.* **60,** 89 (1971).
7. M. Ellenberger, L. Pogliani, K. Häuser and J. Valat, *Chem. Phys. Letters* **27,** 419 (1974).
8. R. J. Abraham, *Analysis of High Resolution NMR Spectra* Elsevier, Amsterdam, 1971.
9. R. J. Abraham, *Analysis of High Resolution NMR Spectra* Elsevier, Amsterdam, 1971, p. 106.

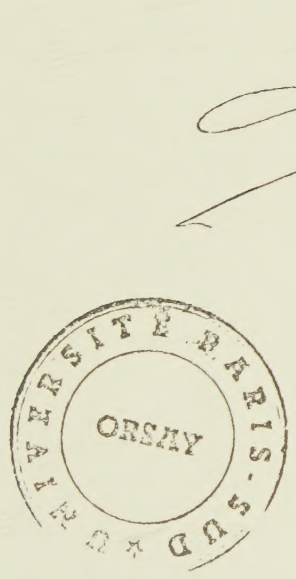
10. L. M. Jackman and S. Sternhell, *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*, 2nd Edn., Pergamon, Oxford, 1969.
11. M. Zanger, *Org. Magn. Resonance* **4**, 1 (1972).
12. R. R. Ison, P. Partington and G. C. K. Roberts, *Mol. Pharmacol.* **9**, 756 (1973).
13. D. G. de Kowalewski, R. Buitrago and R. Yommi, *J. Mol. Structure* **11**, 195 (1972).
14. D. G. de Kowalewski, R. Buitrago and R. Yommi, *J. Mol. Structure* **16**, 395 (1973).
15. B. Dischler, *Z. Naturforsch.* **20A**, 888 (1965).

```
LEVEL 21.7 ( JAN 73 )                          OS/360  FORTRAN H

        COMPILER OPTIONS - NAME=  MAIN,OPT=02,LINECNT=60,SIZE=0000K,
                           SOURCE,EBCDIC,NOLIST,NODECK,LOAD,MAP,NOEDIT,ID,NOXREF
              C      CALCUL D UNE DROITE MOYENNE
              C
 ISN 0002             DIMENSION X(20),Y(20)
 ISN 0003          100 FORMAT(I2)
 ISN 0004          101 FORMAT(8F5.2)
 ISN 0005          200 FORMAT(/3HON=,I2//(3H I=,I2,5X,2HX=,F8.4,5X,2HY=,F8.4))
 ISN 0006          201 FORMAT(/3H A=,F8.4,5X,2HB=,F8.4/)
 ISN 0007          202 FORMAT(5H EPS(,I2,2H)=,F8.4)
 ISN 0008            1 READ(5,100) N
 ISN 0009              READ(5,101)(X(I),I=1,N)
 ISN 0010              READ(5,101)(Y(I),I=1,N)
 ISN 0011              IF(N.EQ.0) CALL EXIT
 ISN 0013              WRITE(6,200) N,(I,X(I),Y(I),I=1,N)
 ISN 0014              SX=0
 ISN 0015              SY=0
 ISN 0016              SXY=0
 ISN 0017              SX2=0
 ISN 0018              DO 2 I=1,N
 ISN 0019              SX=SX+X(I)
 ISN 0020              SY=SY+Y(I)
 ISN 0021              SX2=SX2+X(I)**2
 ISN 0022            2 SXY=SXY+X(I)*Y(I)
 ISN 0023              FN=N
 ISN 0024              D=FN*SX2-SX**2
 ISN 0025              A=(FN*SXY-SX*SY)/D
 ISN 0026              FD=D
 ISN 0027              B=(SX2*SY-SX*SXY)/FD
 ISN 0028              WRITE(6,201) A,B
 ISN 0029              DO 3 I=1,N
 ISN 0030              EPS=(Y(I)-A*X(I)+B)
 ISN 0031            3 WRITE(6,202) I,EPS
 ISN 0032              GO TO 1
 ISN 0033              STOP
 ISN 0034              END
```

ANNEXE 3

Vu et approuvé

ORSAY, le 30 juin 1976

Les Membres du Jury :